

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20241024001

http://www.yykxjz.cn/

金夕雨, 李守湖, 吴越, 储旭, 王伟, 房文红, 李新苍. 拟穴青蟹苗种 MCRV 检测方法的建立及应用. 渔业科学进展, 2025, 46(4): 230–238

JIN X Y, LI S H, WU Y, CHU X, WANG W, FANG W H, LI X C. Establishment and application of MCRV detection method for larvae of mud crab, *Scylla paramamosain*. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(4): 230–238

拟穴青蟹苗种 MCRV 检测方法的建立及应用*

金夕雨^{1,2} 李守湖¹ 吴越¹ 储旭¹ 王伟¹ 房文红¹ 李新苍^{1①}

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业农村部低洼盐碱地水产养殖重点实验室 上海 200090;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)苗种携带青蟹呼肠孤病毒(mud crab reovirus, MCRV)对后期养殖具有极大的风险。培育无 MCRV 苗种, 从源头切断该病毒传播, 已成为当前青蟹养殖中亟待解决的关键问题。为提高青蟹苗种 MCRV 检测的灵敏度, 本研究选择 MCRV 的高表达基因 *VP11* 作为靶标, 设计特异性引物和 TaqMan-MGB 探针, 以标准品质粒和 RNA 为模板, 通过优化反应体系和反应程序, 建立了一种适用于青蟹苗种 MCRV 检测的 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)方法, 能够实现对 MCRV 的精准检测。在 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μ L 标准品质粒(或 dsRNA)的范围内, 起始模板浓度对数值与反应循环数间呈良好的线性关系, 最低可精确定量 10 copies 标准品质粒或 dsRNA/反应的样品, 该方法最低理论检测极限为 2.5 copies 标准品质粒/反应。以青蟹双顺反子病毒(MCDV)、对虾白斑综合症病毒(WSSV)、十足目虹彩病毒(DIV1)、虾肝肠胞虫(EHP)及副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)核酸样品作为模板进行检测, 均未产生特异性扩增。该检测方法对质粒和 dsRNA 样品的变异系数分别为 1.40%和 0.98%, 具有良好的重复性和稳定性。使用该方法和 SYBR Green qRT-PCR 方法同时对 14 份不同发育阶段蚤状幼体进行检测, MCRV 检出率分别为 78.57%和 57.14%。上述研究结果表明, 该检测方法稳定性好、特异性强、灵敏性更高, 适用于不同发育阶段青蟹幼体的 MCRV 检测, 可为无 MCRV 青蟹苗种的生产提供关键技术支撑。

关键词 拟穴青蟹; MCRV; 检测方法; TaqMan qRT-PCR; 苗种

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)04-0230-09

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*), 俗称青蟹, 隶属于十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae)、青蟹属(*Scylla*)(林琪等, 2007), 是我国重要的经济蟹类之一。青蟹呼肠孤病毒(mud crab reovirus, MCRV)是导致青蟹高死亡率的主要病原之一, 其基因组共包含 12 个节段的线性 dsRNA, 预测可编码 13 个开放阅读框(ORF)(Weng *et al*, 2007)。Weng 等(2007)研究显示,

自然感染 MCRV 的青蟹短期死亡率可达 70%。近年来的流行病学调查结果显示, 青蟹 MCRV 流行性进一步增强, 但发病周期显著变长(申亚阳等, 2017; Chu *et al*, 2023)。储旭等(2023)研究发现, 在青蟹繁育过程中, 青蟹种蟹(雌性亲蟹)、受精卵及幼体均存在 MCRV 感染现象。因此, 探明青蟹受精卵、蚤状幼体 MCRV 携带情况, 有利于阐明 MCRV 在青蟹苗种繁

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2024ZX03; 2023TD43)、上海市自然科学基金(22ZR1478600)和国家自然科学基金(32473211)共同资助。金夕雨, Email: rainie0502@163.com

① 通信作者: 李新苍, 研究员, Email: lixin8687@163.com

收稿日期: 2024-10-24, 收修改稿日期: 2024-11-19

育过程中的传播方式, 为从源头控制 MCRV 传播提供技术支撑。考虑到青蟹受精卵、蚤状幼体病毒含量通常较低, 开发高灵敏性的 MCRV 检测方法, 满足受精卵和蚤状幼体病毒检测需要, 显得尤为迫切。

TaqMan 实时荧光定量 PCR (quantitative reverse-transcription PCR, qRT-PCR) 是一种高保真、高灵敏、特异性强的核酸检测技术, 与 SYBR Green qRT-PCR 相比, 该方法背景信号更低、灵敏性更高、特异性和稳定性更好。新型 TaqMan-MGB 探针可使该技术信噪比进一步提升, 实验结果更精确、可靠, 现已被广泛运用于病原检测(Liu *et al.*, 2019; Collins *et al.*, 2010)、医学诊断(Zhao *et al.*, 2005)、物种鉴定(Duan *et al.*, 2024)等领域。

当前的 MCRV 检测方法大多基于病毒 VP1 或 VP6 基因序列而设计(申亚阳等, 2017; 王莹莹, 2021), 由于这 2 个病毒基因表达量较低, 限制了这些检测方法的灵敏性(储旭等, 2023)。储旭等(2023)研究发现, VP11 在 MCRV 感染的青蟹中表达量最高。本研究拟基于高表达的 VP11 基因, 设计 qRT-PCR 引物和 MGB 探针, 优化最佳反应体系和最适反应条件, 建立一种灵敏度高、特异性强、稳定性好的 MCRV 检测方法, 以满足青蟹受精卵和苗种等低 MCRV 含量样品的病毒检测需要。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用青蟹均采自浙江、上海、海南等地某养殖场或水产市场。青蟹双顺反子病毒(mud crab dicistrovirus, MCDV)、对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)、十足目虹彩病毒(Decapod iridescent virus 1, DIV1)、虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) 和副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 5 种病原核酸均为本实验室保存。RNAiso Plus、反转录试剂盒(PrimeScript RT Master Mix)、T7 体外转录试剂盒(*in vitro* Transcription T7 kit for siRNA Synthesis)、DNA Marker 等均购自 TaKaRa 公司, 其他试剂均购自国药集团(分析纯)。

1.2 引物设计

参考 MCRV VP11 基因序列(GenBank 编号 HQ414137.1), 在开放阅读框(open reading frame, ORF)内部设计出标准品质粒的上下游扩增引物、定量检测引物及 TaqMan 探针。含 T7 启动子的引物为 VP11-F(5'-TAATACGACTCACTATAGGGATTCTCC

AGATGCCCCACT-3') 和 VP11-R(5'-TAATACGACTC ACTATAGGGCATAAATGAGA AT A AAGGAC-3'); 定量检测上游引物序列为 5'-GTCAGAATGTCGTTT CCGGACAGAT-3', 扩增长度为 119 bp, 探针序列为 5'-FAM CTGATGCGTTTCGATT MGB-3', 5'端用 FAM 标记, 3'端用 MGB 标记。以上引物及探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 质粒标准品制备

实验室前期研究工作中, 已经构建出 MCRV VP11 的 pMD-19T 载体质粒作为标准品(储旭等, 2023), 使用无菌水将质粒浓度调整为 1.0×10^9 copies/ μ L。

1.4 RNA 标准品制备

用上述质粒作为模板, 以含有 T7 启动子序列的引物进行扩增, 获得的目的片段作为体外转录制备双链 RNA (dsRNA) 模板。随后采用 T7 体外转录试剂盒 *in vitro* Transcription T7 kit (for siRNA Synthesis) (TaKaRa), 按表 1 反应体系进行转录, 制备含有 MCRV VP11 部分片段的 dsRNA 标准品。

表 1 体外转录 RNA 体系
Tab.1 Reaction system for RNA transcription

组分 Component	使用量 Amount
10×Transcription buffer	2.0 μ L
ATP solution (50 mmol/L)	2.0 μ L
GTP solution (50 mmol/L)	2.0 μ L
CTP solution (50 mmol/L)	2.0 μ L
UTP solution (50 mmol/L)	2.0 μ L
RNA 酶抑制剂 RNase inhibitor (40 U/ μ L)	0.5 μ L
T7RNA 聚合酶 T7 RNA polymerase (50 U/ μ L)	2.0 μ L
无 RNA 酶水 RNase free dH ₂ O	x μ L
线性 DNA 模板 Linear template DNA	20 ng~1 μ g
合计 Total	20.0 μ L

使用 NanoDrop One 核酸分析仪(Thermo, 美国)检测 dsRNA 初始浓度, 并计算 dsRNA 标准品的浓度, 计算公式(刘红波等, 2020): dsRNA 浓度(copies/ μ L) = dsRNA 单位体积的质量(g/ μ L)/dsRNA 分子量(g/mol)× (6.02×10^{23} copies/mol), dsRNA 分子量=2×340×nt (nt, RNA 碱基数)。调整 dsRNA 初始浓度, 并按照 10 倍浓度梯度进行系列稀释, 制备标准品。随后, 用反转录试剂盒对上述系列稀释的 dsRNA 进行反转录, 将获得的 cDNA 样品作为后续 qRT-PCR 模板。

1.5 TaqMan-MGB qRT-PCR 体系及相关参数优化

以含 *VP11* 基因的标准品质粒为模板,使用不同终浓度的引物 VP11-F、VP11-R 以及探针 VP11-P(浓度范围均为 0.1~0.6 $\mu\text{mol/L}$)进行 qRT-PCR,优化上、下游引物及探针的最佳浓度[获得最小的 Ct 值(cycle threshold)],并通过设置梯度退火温度(58~65 $^{\circ}\text{C}$),优化退火温度,由此建立最佳反应条件并确定最佳反应程序。

1.6 标准曲线的制作和引物扩增效率的计算

以稀释后的标准品质粒($1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL)为模板,每个浓度梯度样品设置至少 3 次重复,以建立的 qRT-PCR 最佳的反应体系和反应程序进行 PCR 扩增,制作标准曲线,并生成对应的线性方程和回归系数。依据线性方程的斜率计算引物的扩增效率,同时,利用统计学方法计算每个梯度的 Ct 值的变异系数(CV),从而评估检测样品的重复性和稳定性。

1.7 TaqMan-MGB qRT-PCR 方法的灵敏性

在标准品质粒 10 倍系列稀释的基础上,进一步制备 5.0、2.5 和 1.0 copies/ μL 标准品质粒。基于扩增的 Ct 值(y)相对于质粒模板起始浓度(x)的标准曲线,明确 TaqMan qRT-PCR 检测方法以 cDNA 为模板时对 MCRV 的分析灵敏度;基于扩增的 Ct 值(y)相对于 RNA 模板起始浓度(x)的标准曲线,明确 TaqMan qRT-PCR 检测方法以 RNA 为模板时对 MCRV 的分析灵敏度。

1.8 qRT-PCR 方法的特异性

为检测该方法的特异性,以携带 MCRV 的鳃组织样本(3 个)作为阳性对照,健康青蟹(无 MCRV)鳃组织 cDNA 样本作为阴性对照,使用甲壳类动物常见病原核酸样本(包括 MCDV 感染阳性青蟹鳃组织 cDNA 样本, WSSV、DIV1、EHP 及副溶血弧菌的 DNA 样本)进行 qRT-PCR,分析该检测方法的特异性。

1.9 TaqMan-MGB qRT-PCR 方法的应用

为评估该检测方法的实用性并统计 MCRV 对某养殖场蟹苗的感染状况,使用本研究建立的检测方法对 2024 年 3 月采集自浙江宁波的 14 份蚤状幼体样本进行 MCRV 检测,同时,利用 SYBR Green qRT-PCR 法(储旭等, 2023)检测样本中的 MCRV,比较 2 种方法的检测结果。

2 结果

2.1 制备 *VP11* 标准品 dsRNA

以 *VP11* 的 pMD-19T 载体质粒作为模板,使用引物 VP11-dsRNAF 和 VP11-dsRNAR 进行 PCR 扩增,得到一条长度约为 398 bp 的条带(图 1),与预期条带大小相符。回收的 DNA 片段经 T7 体外转录试剂盒合成 dsRNA 后,经微量分光光度计测量,dsRNA 的浓度为 263.71 ng/ μL ,经计算可得 *VP11* 片段的 dsRNA 拷贝数为 5.87×10^{11} copies/ μL ,随后,将 dsRNA 拷贝数调整至 1.0×10^{10} copies/ μL 。

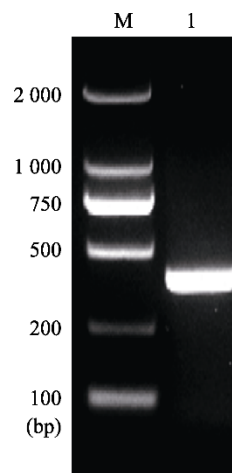


图 1 *VP11* 片段的扩增

Fig.1 The results of target fragment obtained from PCR

M: Marker; 1: 扩增的 DNA 片段。

M: Marker; 1: The amplified DNA fragment.

2.2 优化 TaqMan-MGB qRT-PCR 体系

通过对引物和探针浓度、引物退火温度的优化,确定最佳反应体系为 20 μL : Premix Ex Taq (Probe qPCR) 10 μL , VP11-F 和 VP11-R 各 0.4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), VP11-P 0.4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), ROX 0.4 μL , DNA 模板 2 μL , ddH₂O 6.8 μL 。最佳反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共计 40 个循环。

2.3 以质粒标准品为模板时 qRT-PCR 的标准曲线及灵敏度

采用浓度为 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 copies/ μL 的质粒制作标准曲线(图 2),线性方程为 $C_t = -3.242X + 40.442$ (其中, X 为质粒拷贝数的对数),该线性方程的回归系数 R^2 为 0.998,说明标准曲线上各点值具有良好的线性关系,并且基于标准曲线斜率计算的引物扩增效率为 103.416%,该值

处于该类反应的最优范围内(95%~105%)。统计分析得到, Ct 值变异系数处于 0.2%~1.4%之间, 说明该检测方法具有良好的稳定性和重复性(表 2)。

将浓度为 5.0、2.5 和 1.0 copies/ μ L 的标准品质粒作为 qRT-PCR 模板以确定该检测方法的灵敏度, 结果如图 3 所示。质粒浓度为 10.0 copies/ μ L 时, 样品间重复性很好, 且检测值仍在标准曲线的线性范围内, 表明该检测方法最低可精确定量 10 copies/反应。当质粒浓度为 5.0 copies/ μ L 和 2.5 copies/ μ L 时, 样品间重复性较好, 但已不在线性范围内, 不适用于样品的绝对定量。尽管如此, 这 2 个梯度质粒样品均能获得

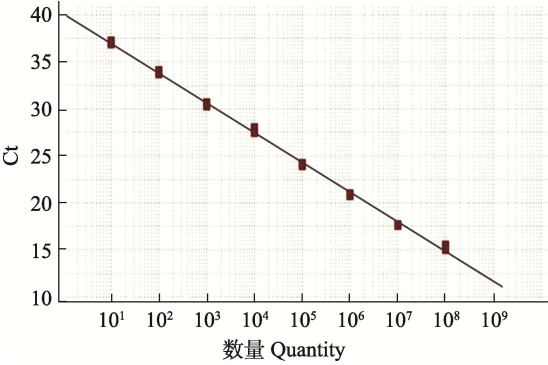


图 2 MCRV 质粒标准品的标准曲线
Fig.2 Standard curve of MCRV plasmid standards

表 2 MCRV 质粒标准品的 Ct 值及变异系数
Tab.2 The Ct values of MCRV plasmid standards and coefficient of variation

拷贝数 Copies/ μ L	Ct				平均值 Means	标准差 SD	变异系数 CV/%
	1	2	3	4			
1.00×10^8	15.508	15.370	15.033	15.199	15.278	0.206	0.014
1.00×10^7	17.672	17.591	17.616	17.630	17.627	0.034	0.002
1.00×10^6	20.973	20.849	20.771	20.923	20.879	0.088	0.004
1.00×10^5	24.014	24.179	24.150	23.940	24.071	0.113	0.005
1.00×10^4	27.984	27.987	27.479	27.698	27.787	0.246	0.009
1.00×10^3	30.300	30.438	30.412	30.640	30.447	0.142	0.005
1.00×10^2	33.736	34.069	33.939	33.768	33.878	0.155	0.005
1.00×10^1	36.351	35.824	36.487	35.769	36.107	0.364	0.010
0.50×10^1	37.027	36.967	37.158	37.184	37.084	0.104	0.003
0.25×10^1	37.699	37.939	37.542	37.580	37.690	0.179	0.005
1.00×10^0	38.757	39.089	36.818	38.008	38.168	1.007	0.026

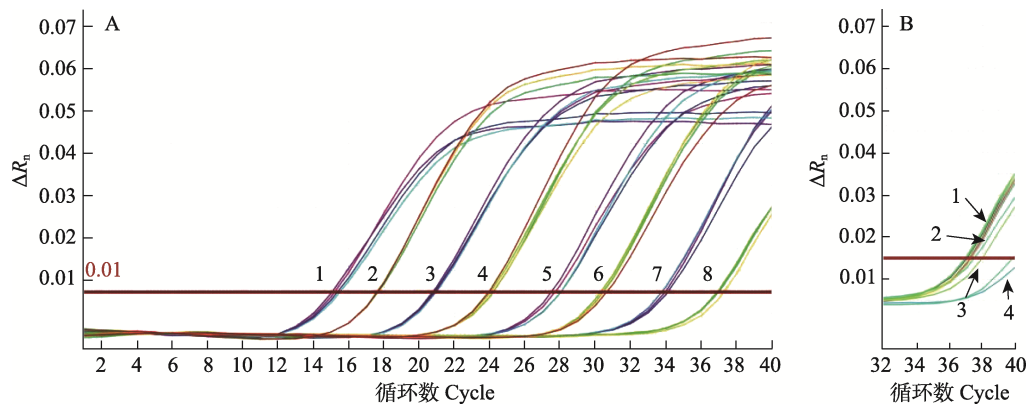


图 3 质粒标准品的扩增曲线和灵敏性分析

Fig.3 The amplification curves and detection sensitivity analysis for MCRV plasmid standards produced by qRT-PCR

A 图中 1~8 号质粒标准品浓度分别为 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 和 1×10^1 copies/ μ L;

B 图中 1~4 号标准品质粒浓度为 10.0、5.0、2.5 和 1.0 copies/ μ L。

In panel A, the concentrations of standard plasmids in samples 1~8 are 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 and 1×10^1 copies/ μ L, respectively. In panel B, the concentrations of standard plasmids in samples 1~4 are 10.0, 5.0, 2.5 and 1.0 copies/ μ L.

扩增曲线,表明仍可用于病毒的定性检测,灵敏度高达 2.5 copies/反应。

2.4 以 RNA 为模板时 qRT-PCR 的标准曲线和灵敏度

以 10 倍梯度稀释的 RNA 标准品作为模板进行 qRT-PCR,结果如图 4 所示。该方法对 RNA 标准品的最低检测浓度为 1×10^1 copies/反应。利用 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 copies/ μ L 浓度的 RNA 制作标准曲线,其线性方程为 $Ct = -3.189X + 41.344$ (其中, X 为 RNA 拷贝数的对数), $R^2=0.998$,说明该方程具有良好的线性关

系;由标准曲线斜率计算出的扩增效率为 105%,介于最优值范围内(95%~105%);利用统计学方法分析得到 Ct 值变异系数处于 0.07%~0.98%之间,说明该检测方法具有良好的稳定性和重复性(表 3)。

2.5 特异性分析

以 MCRV、MCDV、WSSV、DIV1、EHP 及副溶血弧菌核酸样品作为模板进行 TaqMan-MGB qRT-PCR 实验,如图 5 所示,MCRV 样品出现扩增,其他样品均未出现可见的扩增曲线,说明该检测方法特异性强,未与以上病原发生交叉反应。

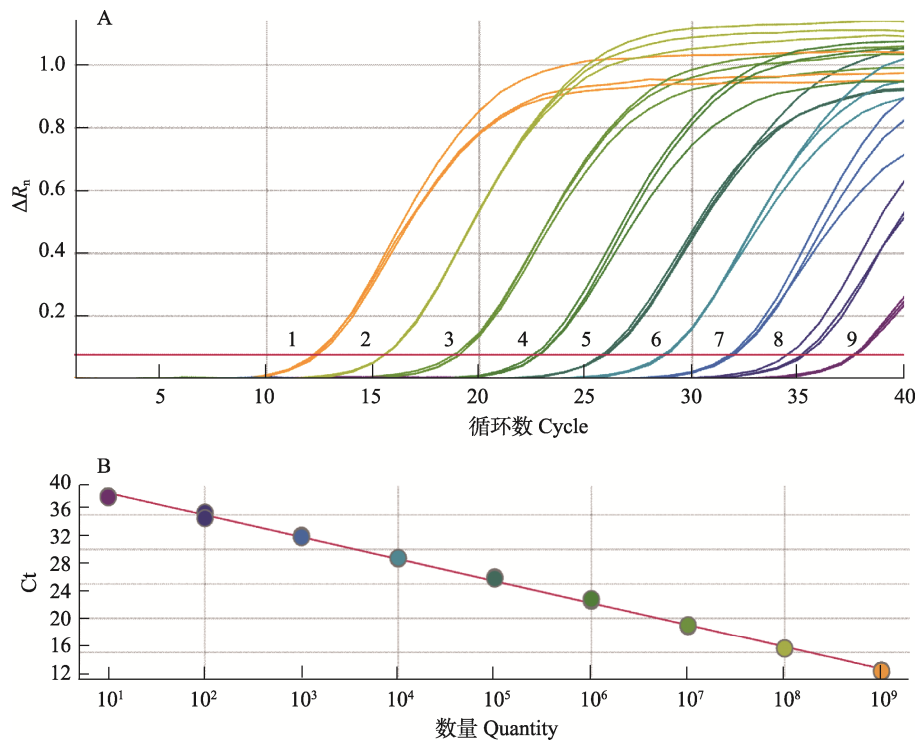


图 4 以 RNA 标准品进行 TaqMan qRT-PCR 生成的扩增曲线(A)和标准曲线(B)
Fig.4 The amplification curves (A) and standard curve (B) of TaqMan qRT-PCR using RNA standard samples

1~9 号 RNA 标准品浓度分别为 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 和 1×10^1 copies/ μ L。
Concentrations of RNA standard in samples 1~9 are 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 and 1×10^1 copies/ μ L, respectively.

表 3 MCRV RNA 标准品的 Ct 值及变异系数
Tab.3 Ct values and variation coefficient of MCRV RNA standards

拷贝数 Copies/ μ L	Ct			平均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV/%
	1	2	3			
1×10^9	12.393	12.293	12.190	12.292	0.083	0.674
1×10^8	15.573	15.569	15.545	15.562	0.012	0.079
1×10^7	19.013	19.003	18.838	18.951	0.080	0.423
1×10^6	22.813	22.777	22.547	22.712	0.118	0.519
1×10^5	25.954	25.899	25.776	25.876	0.074	0.288
1×10^4	28.766	28.761	28.666	28.731	0.046	0.160
1×10^3	31.976	31.909	31.778	31.888	0.082	0.258
1×10^2	35.321	35.103	34.510	34.978	0.343	0.980
1×10^1	37.678	37.554	37.553	37.595	0.059	0.156

2.6 TaqMan-MGB qRT-PCR 检测青蟹苗种 MCRV 感染情况

应用本研究建立的 TaqMan-MGB qRT-PCR 方法对采集的 14 份样品进行 MCRV 检测, 如表 4 所示。检出阳性样品 11 份, 阳性检出率为 78.57%; 利用 SYBR Green qRT-PCR 方法检测到 8 份 MCRV 阳性样品, 检出率为 57.14%。上述结果表明, 本研究中以 *VP11* 为靶标建立的 TaqMan-MGB qRT-PCR 方法在灵敏性方面更具有优势。

3 讨论

养殖虾蟹苗种携带特定病原可导致养殖后期疾病暴发, 其潜在危害尤为严重(刘顺等, 2022; 许杰等, 2018)。净化虾蟹苗种的特定病原, 从源头上控制病原传播, 已成为当前虾蟹疾病防控的共识(董宣等, 2025), 建立高灵敏性病原检测方法是确保苗种无特定病原携带的前提条件。本研究基于 MCRV 高表达基因 *VP11*, 建立了 TaqMan-MGB qRT-PCR 检测方法,

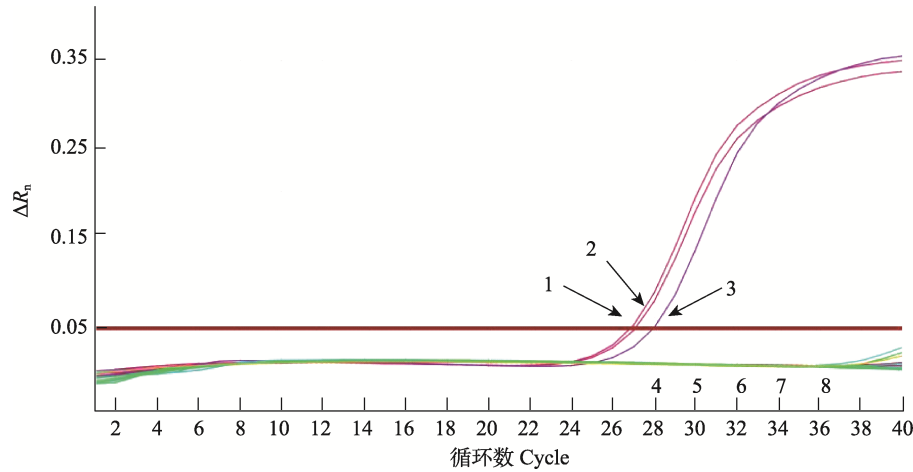


图 5 MCRV 特异性实验结果
Fig.5 The results of MCRV-specific assay for primers used in qRT-PCR

1~3: MCRV 阳性样品; 4: MCDV 阳性青蟹鳃组织 cDNA 样品; 5: WSSV DNA 样品; 6: DIV1 DNA 样品;
7: EHP DNA 样品; 8: 副溶血弧菌 DNA 样品。
1-3: MCRV positive controls; 4: The cDNA sample from MCDV-infected gills of mud crab; 5: WSSV DNA sample;
6: DIV1 DNA sample; 7: EHP DNA sample; 8: *Vibrio parahaemolyticus* DNA sample.

表 4 TaqMan-MGB qRT-PCR 和 SYBR Green qRT-PCR 检测青蟹苗种 MCRV 感染情况

样品编号 Sample No.	样品类型 Sample type	TaqMan qRT-PCR 检测结果 Tested results	SYBR Green qRT-PCR 检测结果 Tested results
2024032600801	蚤 I 期 Zoea stage I	阳性 Positive	阳性 Positive
2024032600802	蚤 I 期 Zoea stage I	阳性 Positive	阳性 Positive
2024032600803	蚤 I 期 Zoea stage I	阴性 Negative	阴性 Negative
2024032600804	蚤 I 期 Zoea stage I	阳性 Positive	阳性 Positive
2024032600805	蚤 I 期 Zoea stage I	阴性 Negative	阴性 Negative
2024032600901	蚤 II 期 Zoea stage II	阳性 Positive	阳性 Positive
2024032600902	蚤 II 期 Zoea stage II	阴性 Negative	阴性 Negative
2024032600903	蚤 II 期 Zoea stage II	阳性 Positive	阳性 Positive
2024032600904	蚤 II 期 Zoea stage II	阳性 Positive	阳性 Positive
2024032601001	蚤 IV 期 Zoea stage IV	阳性 Positive	阴性 Negative
2024032601002	蚤 IV 期 Zoea stage IV	阳性 Positive	阴性 Negative
2024032601003	蚤 IV 期 Zoea stage IV	阳性 Positive	阴性 Negative
2024032601101	蚤 V 期 Zoea stage V	阳性 Positive	阳性 Positive
2024032601102	蚤 V 期 Zoea stage V	阳性 Positive	阳性 Positive

该方法特异性强、灵敏性更高,能很好地满足青蟹苗种 MCRV 检测的需要。

目前,双重巢式 PCR (申亚阳等, 2017)、逆转录 PCR (RT-PCR) (Guo *et al.*, 2008)、逆转录环介导等温扩增技术(RT-LAMP) (熊娟, 2011)、逆转录环介导等温扩增-侧流层析试纸条法(RT-LAMP-LFD) (王莹莹, 2021)等技术已被应用于 MCRV 的检测,这些检测方法大多选择 VP1 或 VP6 作为靶标序列。这 2 个基因虽然保守性好,但表达水平相对较低,在一定程度上会限制活体内病毒检测的灵敏性。本实验室前期曾对青蟹体内 MCRV 的 13 个基因的表达水平进行检测,结果显示,VP11 基因表达量最高。因此,基于 VP11 基因序列设计引物和探针,能够在样品靶标序列含量上提高 MCRV 检测方法的灵敏性。此外,与传统 TaqMan 探针相比,TaqMan-MGB 探针具备更明显的优势,该探针需要的碱基序列更短,意味着在目标序列中可选择范围更广泛,降低了探针设计难度,在不增加碱基数的情况下将探针的退火温度提高了约 10 °C,进一步提高了扩增的特异性,并且 MGB 探针在错配碱基的识别和信噪方面的表现也都优于其他探针(党悦旖等, 2023; Zhou *et al.*, 2023)。本研究以 MGB 探针为基础建立了苗种 MCRV 检测方法,提高了扩增特异性和灵敏性。

qRT-PCR 因其检测灵敏性高,特异性强和稳定性好等特点,已成为实验室病原检测的主流技术(Espy *et al.*, 2006)。针对 MCRV 定量检测,崔亚婷(2015)早期建立了一种 TaqMan qRT-PCR 检测技术,但作者对该检测方法的灵敏性和特异性均未进行深入研究。本课题组曾针对青蟹种蟹筛选建立了一种基于 SYBR Green qRT-PCR 的 MCRV 检测方法,其精确定量下限为 50 copies/反应。但该方法用于青蟹苗种 MCRV 检测,灵敏性稍显不足。为此,本研究基于高表达靶标基因和 TaqMan-MGB 探针技术建立新的 MCRV 定量检测方法,其精确检测下限为 10 copies/反应。与目前存在的 MCRV qRT-PCR 相比,病毒精确定量的灵敏度显著提高(储旭等, 2023)。此外,以质粒作为模板时,该检测方法对 2.5 copies/反应(理论值)的样品量仍有较好的扩增曲线(无法准确定量),表明该检测方法的定性检测下线已接近理论值(1 copies/反应),提示该检测方法灵敏度非常高,达到了 qRT-PCR 检测方法的理想水平。

评估检测技术的特异性是新建检测方法应用的必要条件。除 MCRV 外, MCDV、WSSV、DIV1 及副溶血弧菌也是养殖青蟹的常见病原。为了分析该检测方法的特异性,本研究制备了上述病原的组织核酸

或病原核酸样品。此外,考虑到对虾巨大的养殖规模以及青蟹存在混养模式(农业农村部渔业渔政管理局等, 2024; 熊建华等, 2021),本研究也制备了对虾常见病原 EHP 的组织核酸样品,用于该检测方法的特异性评估。研究结果显示,以 MCDV、WSSV、DIV1 和 EHP 感染组织核酸及副溶血弧菌核酸样品作为扩增模板进行 TaqMan-MGB qRT-PCR 检测,均未出现特异性扩增,表明该检测方法特异性强,上述病原的存在不影响该检测方法的检测结果。

为进一步验证该检测方法的实用性并了解苗种的 MCRV 感染情况,使用该检测方法对采自浙江宁海某青蟹繁育场的 14 份蚤状幼体样本进行 MCRV 检测。检测结果显示,14 份样品中有 11 份检出阳性, MCRV 感染率为 78.57%。与此同时,本研究还开展了对比实验,使用 SYBR Green qRT-PCR 方法检测上述核酸样品,发现 14 份样品中共检出 8 份阳性。表明本研究建立的 TaqMan-MGB qRT-PCR 检测方法灵敏性更强,能更好地避免假阴性苗种上市。病原检测结果同时也表明,青蟹苗种 MCRV 感染较为普遍,携带 MCRV 的苗种进入养殖池塘会导致青蟹陆续死亡,这很可能是当前养殖青蟹单产低下的主要原因。

综上所述,本研究建立了一种针对 MCRV 的 TaqMan-MGB qRT-PCR 定量和检测方法,该方法稳定性好、特异性强、灵敏性高,特别适用于青蟹苗种 MCRV 的检测,为青蟹 SPF 苗种生产提供了技术支撑。此外,该检测技术还可用于青蟹苗种病毒定量,在分析 MCRV 感染规律及其在繁育阶段的传播方式研究中展示了良好的应用前景。

参 考 文 献

- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2024. Beijing: China Agricultural Press, 2024 [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. 中国渔业统计年鉴 2024. 北京: 中国农业出版社, 2024]
- CHU X, FANG W H, LIU Z Q, *et al.* A new SYBR green qRT-PCR diagnostic method for screening MCRV-free breeding mud crabs. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(5): 172-181 [储旭, 房文红, 刘志强, 等. 一种筛选无青蟹呼肠孤病毒(MCRV)种蟹的荧光定量 RT-PCR 检测方法及其应用. *渔业科学进展*, 2023, 44(5): 172-181]
- CHU X, ZHANG B, FANG W H, *et al.* Identification, genome sequencing, and virulence variation analysis of MCRV-NH, an epidemic reovirus strain in cultured mud crab, *Scylla*

- paramamosain*. *Aquaculture*, 2023, 569: 739366
- COLLINS C M, KERR R, MCINTOSH R, *et al.* Development of a real-time PCR assay for the identification of *Gyrodactylus* parasites infecting salmonids in northern Europe. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2010, 90(2): 135–142
- CUI Y T. Effect of temperature on the proliferation of mud crab dicistrovirus-1 and reovirus and their tissue distribution. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [崔亚婷. 温度对青蟹双顺反子病毒-1 和呼肠孤病毒增殖的影响以及病毒的组织分布. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- DANG Y Y, TIAN S Y, PAN J J, *et al.* Establishment and application of TaqMan-MGB probe PCR detection method for human papillomavirus type 23. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2023, <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20231129.001> [党悦旖, 田澍瑶, 潘娟娟, 等. 人乳头瘤病毒 23 型 TaqMan-MGB 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用. 中国动物传染病学报, 2023, <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20231129.001>]
- DONG X, HUANG J. Ensuring the sustainable and high-quality development of aquaculture through biosecurity: A review and prospects. *Progress in Fishery Sciences*, 2025, 46(1): 161–182 [董宣, 黄健. 生物安全保障水产养殖绿色高质量发展: 回顾与展望. 渔业科学进展, 2025, 46(1): 161–182]
- DUAN R H, HUANG J H, ZHANG D H, *et al.* Identification of lethal species in *Amanita* section Phalloideae based on nucleotide signature and specific TaqMan-MGB probe and primer. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1301085
- ESPY M J, UHL J R, SLOAN L M, *et al.* Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, 19(1): 165–256
- GUO Z X, WENG S P, LI G, *et al.* Development of an RT-PCR detection method for mud crab reovirus. *Journal of Virological Methods*, 2008, 151(2): 237–241
- LIN Q, LI S J, LI Z B, *et al.* Species composition in genus *Scylla* from the coast of southeast China. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(2): 211–219 [林琪, 李少菁, 黎中宝, 等. 中国东南沿海青蟹属(*Scylla*)的种类组成. 水产学报, 2007, 31(2): 211–219]
- LIU C, GUO Y M, CAO J Z, *et al.* Detection and quantification of *Aeromonas schubertii* in *Channa maculata* by TaqMan MGB probe fluorescence real-time quantitative PCR. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(1): 109–117
- LIU H B, CONG S R, XU D H, *et al.* Establishment of a one-step TaqMan real-time quantitative PCR assay to detect Cocksackievirus A6. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2020, 41(11): 1314–1317 [刘红波, 丛山日, 许丹菡, 等. 柯萨奇病毒 A 组 6 型 TaqMan 一步法实时荧光定量 PCR 方法的建立. 国际检验医学杂志, 2020, 41(11): 1314–1317]
- LIU S, WENG X Z, ZHENG X Y, *et al.* PCR detection of four pathogens in *Litopenaeus vannamei* in Taizhou of Zhejiang Province from 2017 to 2019. *Progress in Veterinary Medicine*, 2022, 43(3): 137–141 [刘顺, 翁歆之, 郑晓叶, 等. 2017 年-2019 年浙江台州地区凡纳滨对虾 4 种病原 PCR 检测. 动物医学进展, 2022, 43(3): 137–141]
- SHEN Y Y, YANG K, MA H L, *et al.* Molecular epidemiological investigation of the mud crab reovirus and mud crab discistrovirus-1 in mud crab (*Scylla paramamosain*) along the coast of Guangdong Province. *Ecological Science*, 2017, 36(1): 17–24 [申亚阳, 杨铿, 马红玲, 等. 广东沿海地区拟穴青蟹呼肠孤病毒和双顺反子病毒-1 的分子流行病学调查. 生态科学, 2017, 36(1): 17–24]
- WANG Y Y. Rapid diagnosis of reovirus and study on biological function of VP6 gene in *Scylla paramamosain*. Master's Thesis of Jiangsu University, 2021 [王莹莹. 拟穴青蟹呼肠孤病毒快速诊断及其 VP6 基因生物学功能研究. 江苏大学硕士研究生学位论文, 2021]
- WENG S P, GUO Z X, SUN J J, *et al.* A reovirus disease in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in Southern China. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30(3): 133–139
- XIONG J H, FANG H Y, GAO X D, *et al.* Ecological polyculture model of *Penaeus vannamei* pond grass and blue crab. *Journal of Aquaculture*, 2021, 42(8): 41–43 [熊建华, 方怀义, 高旭东, 等. 南美白对虾池塘种草与青蟹生态混养模式. 水产养殖, 2021, 42(8): 41–43]
- XIONG J. Sequencing and analysis of partial genome of *Scylla serrata* reovirus and RT-LAMP detection methods development. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2011 [熊娟. 锯缘青蟹呼肠孤病毒部分基因序列的测定及其 RT-LAMP 检测方法的建立. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2011]
- XU J, HUO W H, DENG W, *et al.* Investigation on prevalence status of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Tianjin from 2015 to 2017. *China Animal Health Inspection*, 2018, 35(8): 13–16 [许杰, 霍文慧, 邓威, 等. 2015—2017 年天津市虾肝肠胞虫流行情况调查. 中国动物检疫, 2018, 35(8): 13–16]
- ZHAO J R, BAI Y J, ZHANG Q H, *et al.* Detection of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using TaqMan-MGB probe technology. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11(4): 508–510
- ZHOU B Q, YANG G P, HU Z, *et al.* Development of a real-time quantitative PCR based on a TaqMan-MGB probe for the rapid detection of *Theileria haneyi*. *Microorganisms*, 2023, 11(11): 2633

(编辑 马瑾艳)

Establishment and Application of MCRV Detection Method for Larvae of Mud Crab, *Scylla paramamosain*

JIN Xiyu^{1,2}, LI Shouhu¹, WU Yue¹, CHU Xu¹, WANG Wei¹, FANG Wenhong¹, LI Xincang^{1①}

(1. Key Laboratory of Aquaculture on Saline-Alkaline Land, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract Mud crab reovirus (MCRV) present in *Scylla paramamosain* larvae poses notable risks to the late stage of mud crab aquaculture. The cultivation of MCRV-free larvae and prevention of virus transmission at its source have become critical issues that must be urgently addressed in mud crab aquaculture. Owing to the low viral load in fertilized eggs and larvae of mud crabs, we attempted to establish a more sensitive detection method for MCRV. Most of the current MCRV detection methods are based on the *VP1* and *VP6* genes of MCRV, which limit the sensitivity of detection methods owing to the low expression of these two genes. Our previous studies found that detection sensitivity was significantly improved by using *VP11* as the target gene because *VP11* is the highest expression gene of MCRV in mud crabs. In addition, compared with SYBR Green qRT-PCR, TaqMan-MGB qRT-PCR typically has higher sensitivity in theory. Therefore, in this study, we selected the highly expressed *VP11* of MCRV as the target gene, designed specific primers and TaqMan-MGB probes, and established a qRT-PCR detection method suitable for MCRV in mud crab larvae by optimizing the reaction system and procedure, using standard plasmid and RNA as the templates. The final reaction components were as follows: 10 μ L Premix Ex Taq (Probe qPCR), 0.4 μ L VP11-F (10 μ mol/L), 0.4 μ L VP11-R (10 μ mol/L), 0.4 μ L VP11-P (10 μ mol/L), 0.4 μ L ROX, 2 μ L DNA template, and 6.8 μ L ddH₂O. The final procedure was as follows: Initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s and 60 °C for 30 s. The results showed a good linear relationship between the log value (starting quality, Sq) and number of reaction cycles within the range of $1 \times 10^8 - 1 \times 10^1$ copies/ μ L of standard plasmids (or dsRNA). Standard plasmids or dsRNA can be accurately quantified with a minimum of 10 copies, and the minimum theoretical detection limit is 2.5 copies/reaction of standard plasmids. The coefficients of variation of this detection method for plasmid and dsRNA samples were 1.4% and 0.98%, respectively, showing good repeatability and stability. When MCRV, MCDV, WSSV, DIV1, EHP, and *Vibrio parahaemolyticus* nucleic acid samples were used as templates for MCRV detection, no specific amplification was observed except for MCRV samples, indicating that this detection method is highly specific for MCRV. To further validate the practicality and sensitivity of TaqMan-MGB qRT-PCR, 14 batches of mud crab larvae with suspected MCRV infection were detected using this method, and SYBR Green qRT-PCR method was also used to analyze the samples simultaneously. The MCRV detection rate of the former was 78.57%, and the latter was only 57.14%, indicating that TaqMan-MGB qRT-PCR has a higher sensitivity than the SYBR Green method. These findings indicate that the newly established detection method has strong specificity and stability, as well as higher sensitivity. This detection method can be applied to screening MCRV in mud crab larvae at different developmental stages and provide technical support for the production of MCRV-free mud crab seedlings.

Key words *Scylla paramamosain*; MCRV; Detection method; TaqMan qRT-PCR; Larvae

① Corresponding author: LI Xincang, Email: lixin8687@163.com