

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220404001

http://www.yykxjz.cn/

储旭, 房文红, 刘志强, 周俊芳, 李信书, 李新苍. 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, FANG W H, LIU Z Q, ZHOU J F, LI X S, LI X C. A new SYBR green qRT-PCR diagnostic method for screening MCRV-free breeding mud crabs. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(5): 172-181

# 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\*

储旭<sup>1,2</sup> 房文红<sup>2</sup> 刘志强<sup>2</sup> 周俊芳<sup>2</sup> 李信书<sup>1①</sup> 李新苍<sup>2①</sup>

(1. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室 江苏 连云港 222005;

2. 农业农村部东海渔业资源开发利用重点实验室 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)

**摘要** 青蟹呼肠孤病毒(mud crab reovirus, MCRV)是养殖拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)致死率最高的病原之一,青蟹种蟹及其幼体携带该病原对青蟹养殖产业的高质量发展造成了重大威胁。为从源头切断该病原的感染和传播,本研究研发了一种筛选无 MCRV 种蟹的荧光定量检测方法。为最大限度地提高检测灵敏性,首先,本研究分析 MCRV 在感染青蟹主要组织中的含量,发现血淋巴中病毒载量最高;随后,分析该病毒的 13 个预测基因在血淋巴中的表达水平,发现病毒 VP11 基因相对表达量最高;最后,基于 VP11 基因序列保守区设计特异引物,建立了一种 SYBR Green quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR)检测方法,该方法可精确检测的病毒下限为 50 copies/反应。该检测方法具有组织和靶标基因选择优势,灵敏性显著高于早期报道的其他检测方法。使用该方法对含有 5 种常见甲壳动物病原的样品进行检测,均无特异性扩增。抽取微量血淋巴(大约 50 μL/只)提取 RNA,随后使用该检测方法对 22 只种蟹和 20 只市售青蟹进行 MCRV 检测,阳性率分别 54.44%和 85.00%。此外,利用该方法进一步分析了 MCRV 在较低温度下(21 °C)在青蟹体内的增殖情况,发现病毒感染早期 MCRV 呈指数方式增殖,随后进入平台期,实验周期内无青蟹死亡。总之,本研究建立了一种灵敏性高、实用性强的 MCRV 检测方法,既可用于微创条件下无 MCRV 种蟹筛选,也能满足病原感染相关研究的需要。

**关键词** MCRV; 检测方法; 青蟹种蟹; 定量 RT-PCR

**中图分类号** S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)05-0172-10

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)俗称青蟹,是我国重要的海水养殖品种。病害是青蟹健康养殖主要的威胁(蔡小辉等, 2013; 郑天伦, 2014),青蟹呼肠孤病毒(mud crab reovirus, MCRV)是养殖青蟹的主要病原(Weng *et al*, 2007)。MCRV 是一种双链无囊膜 RNA

病毒,基因组包含 12 个节段,预测可编码 13 个开放阅读框(ORF) (Chen *et al*, 2011、2012)。早期研究显示,该病毒感染可导致锯缘青蟹(*Scylla serrata*)近 100% 的死亡率(Weng *et al*, 2007)。近年来的研究显示,该病毒感染非常普遍,几乎所有青蟹养殖池塘都可以检

\* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2021M02)、上海市自然科学基金(22ZR1478600)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD41)共同资助。储旭, E-mail: 641173078@qq.com

① 通信作者: 李信书, 教授, E-mail: xinshul@sina.com; 李新苍, 研究员, E-mail: lixin8687@163.com

收稿日期: 2022-04-04, 收修改稿日期: 2022-05-11

测到该病毒(申亚阳等, 2017)。因此, 筛选无 MCRV 种蟹, 从繁育阶段净化病原、获取无 MCRV 病原苗种(SPF)势在必行。

目前, 普通 RT-PCR、RT-LAMP、巢式 RT-PCR 和荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测方法已应用于 MCRV 检测(熊娟, 2011; 张迪等, 2013a、b)。上述检测方法引物设计主要是基于 *VPI* 基因(病毒 RNA 聚合酶基因), 考虑到该基因表达水平不高, 限制了检测方法的灵敏性, 需要挑选表达水平更高的靶标基因设计检测引物, 提高检测方法的灵敏性。此外, 目前的检测方法通常取青蟹鳃组织进行病毒检测, 这种杀死青蟹进行病毒检测的方法显然不适用于良种场无毒种蟹筛选。因此, 有必要研发对青蟹损伤小的取样方法。

qRT-PCR 技术具有灵敏度高、特异性强、准确可靠等特点, 已广泛应用于病原定量检测等(Lee *et al.*, 2006)。与 TaqMAN 探针法、分子信标法和 LUX 引物法相比(Rekhviashvili *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2019; 宋增磊等, 2019; 桑松文等, 2021), 基于 SYBR Green 的 qRT-PCR 检测方法引物设计简单、费用低且具有独特的熔解曲线分析程序, 使其成为当前应用最为广泛的病原检测技术之一(李新苍等, 2012)。本研究将基于表达量更高的病毒基因设计引物, 并借助 SYBR Green qRT-PCR 检测方法的灵敏性和实用性, 研发对青蟹创伤小的 MCRV 检测方法, 满足青蟹种蟹 MCRV 净化需要。

## 1 材料与方

### 1.1 实验动物和病毒核酸样品

实验用健康青蟹来自上海崇明某养殖场, 将 2021 年 5 月采自海南的 22 只种蟹和 2021 年 9 月采自浙江的 20 只商品青蟹用于病原检测。MCRV 为本实验室于 2020 年从浙江某养殖场分离鉴定的野毒株。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 1 (Decapod iridescent virus 1, DIV1)、虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) 5 种病原核酸均来自本实验室保存的病原样品。

### 1.2 主要试剂和总 RNA 提取

TB Green II、反转录试剂盒(Primescript RT Master Mix)、DNA Marker 等均购自 TaKaRa 公司, 总 RNA 提取试剂盒(Transzol UP Plus RNA Kit)购自北京全式金生物。将青蟹冰浴 5 min 后, 用无菌注射器抽取少量血淋巴(约 50  $\mu$ L)进行 RNA 抽提; 随后,

解剖青蟹, 取鳃、肝胰腺、心、胃、肠和肌肉组织, 抽提各组织的总 RNA。总 RNA 提取及反转录具体步骤按照试剂盒操作说明书进行, 以总 RNA 为模板, 热变性后加入随机引物进行反转录, 合成的 cDNA 用于随后的定量分析。

### 1.3 引物设计与合成

参考 MCRV 基因组 12 个节段序列(GenBank 编号 HQ414127.1-HQ414138.1), 利用在线软件预测病毒全部基因的编码区, 在病毒基因编码序列内部设计定量引物; 与此同时, 选择 18S rRNA 作为内参基因并设计其定量引物。上述引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.4 MCRV 在青蟹各组织中的相对含量分析

MCRV 阳性青蟹采自浙江某养殖场, 选取 6 只青蟹用于分析病毒侵染的组织分布情况。使用 qRT-PCR 方法分析 MCRV 在各组织中的相对含量, 病毒基因引物为 VP11RF 和 VP11RR, 内参基因引物为 18SF 和 18SR (表 1)。qRT-PCR 体系和参数采用仪器推荐的快速反应程序。反应体系: TB Green II 10  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.4  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), 无菌水 6.8  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, ROX 染料 0.4  $\mu$ L, 总体积为 20  $\mu$ L。反应参数: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 60 s, 读板 1 次; 共 40 个循环; 最后, 将温度从 60  $^{\circ}$ C 提高到 95  $^{\circ}$ C, 期间每增加 0.5  $^{\circ}$ C 检测 1 次荧光值。反应体系样品加入 96 孔反应板后置于荧光定量 PCR 仪(QuantStudio 6 Flex, ABI)上进行检测。病毒在各组织中的相对含量按照公式(病毒相对含量 =  $2^{18S\ rRNA\ C_T - MCRV\ C_T}$ )进行计算。使用 GraphPad Prism 9 软件对数据进行处理, *t* 检验进行显著分析。

### 1.5 MCRV 编码基因在血淋巴中的表达水平分析

为分析 MCRV 基因相对表达水平, 对 13 个预测的病毒基因分别设计并合成相应特异性引物(表 1)。以 18S rRNA 作为内参基因, 通过 qRT-PCR 分析各基因的相对表达量。病毒感染青蟹血淋巴 cDNA 作为定量反应体系模板, 反应条件和体系采用步骤 1.4 的快速反应程序。使用 OriginPro 9.1 软件对数据进行处理, *t* 检验进行显著分析。

### 1.6 病毒 *VP11* 基因核酸片段扩增

以病毒 cDNA 为模板, 利用引物 MCRVVP11F1 和 MCRVVP11R1 进行 PCR 扩增, 获取制备标准品质粒的核酸片段。反应体系: Ex Taq 酶 25  $\mu$ L, 灭菌水 20  $\mu$ L, 上下游引物各 2  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), 模板 cDNA

表1 引物序列信息

Tab.1 Primers used in this study

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 Primers (5'~3')	扩增片段 Amplicon/bp
qRT-PCR 目标基因 qRT-PCR target gene			
VP1	MCRVVP1RF	GTTCCCTGGACAGGCACTCA	115
	MCRVVP1RR	CGATGGAAATCTTGCCCTGA	
VP2	MCRVVP2RF	ATTCGTAGACGGCGAGGGA	111
	MCRVVP2RR	GGTGAGAATTTCTTGCCCTGG	
VP3	MCRVVP3RF	GGACCTAATGATGAGGCAACG	124
	MCRVVP3RR	AGGTGTTTGGACCCAGTATTTG	
VP4	MCRVVP4URF	TGGGCTGGTCCCTACCTTTA	150
	MCRVVP4URR	TAGCTGGGTTGGCTCGTTT	
	MCRVVP4DRF	TTTCAAAGGTTTCACGGTCAC	
VP5	MCRVVP4DRR	TCCTCACGCATTATCATAACATCT	161
	MCRVVP5RF	TCGTGATTGAACAAGGGCAG	
VP6	MCRVVP5RR	AACAGGTCGTGATACGGCTCT	199
	MCRVVP6RF	TCCGCAACAAAGAAGATACAGT	
VP7	MCRVVP6RR	AGTCACCAAGCGTGCTAAAAC	114
	MCRVVP7RF	GCTGAGACCATTCTGGGCTAT	
VP8	MCRVVP7RR	GACGATAGTGACTCTGACCATTG	123
	MCRVVP8RF	CAGCCTACAAGCAATGGGAAT	
VP9	MCRVVP8RR	GCCTCTTTTGGCACGGGTT	77
	MCRVVP9RF	TCTGACCGATGAGGATACTTC	
VP10	MCRVVP9RR	ATCTTCTCGACTATGACCTTTGT	159
	MCRVVP10RF	TCACCACCGCCCTATCCTGT	
VP11	MCRVVP10RR	CGAGTCCGTAAGAGTCCTAATGT	171
	MCRVVP11RF	CACCCCTAACCACCATCCCTAT	
VP12	MCRVVP11RR	CTTCCTAATCGCAAAGAACAACC	104
	MCRVVP12RF	GGTAATGGTGCCAAATCGTT	
qRT-PCR 内参基因 qRT-PCR reference gene	MCRVVP12RR	TCCAGGTGGTGGTTTGATGT	198
	18S RNA	18SF	
RT-PCR	18SR	GACTCAACACGGGGAACCTCA	121
	VP11 核酸片段 VP11 fragment	MCRVVP11F1	
	MCRVVP11R1	GCAAATTGAACTACTACTACTTA	725

(200 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 总体积 50  $\mu$ L。PCR 条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 共 35 循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 终止反应。

### 1.7 标准品质粒构建与稀释

病毒 VP11 基因片段 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 目标片段回收后连接到 pMD19-T 载体, 随后转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞, 将 PCR 筛选获得的阳性克隆菌株进行培养。按

照质粒提取试剂盒(TaKaRa)说明书提取质粒, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。确认质粒构建成功后, 通过微量分光光度计测其 OD<sub>260 nm</sub> 和 OD<sub>280 nm</sub> 值(1 OD 吸光值相当于 50  $\mu$ g/mL 的 dsDNA), 从而确定质粒纯度并计算质粒总质量。每微升质粒拷贝数(copies/ $\mu$ L)=质粒质量浓度( $\mu$ g/ $\mu$ L)/质粒分子量; 质粒分子量=2 $\times$ 330 $\times$ nt (其中, nt 为质粒的碱基数)。将标准品质粒进行 9 次 10 倍稀释, 直到 10<sup>0</sup> copies/ $\mu$ L, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

## 1.8 SYBR Green qRT-PCR 体系及相关参数的确定

以含 *VP11* 基因片段的标准品质粒为模板, 使用引物 VP11RF 和 VP11RR 进行 qRT-PCR, 通过分析 PCR 产物的熔解曲线, 确定引物的特异性与可行性。在此基础上, 通过正交实验确定上、下游引物的最佳配比浓度(获得最小的  $C_T$  值), 并通过温度梯度实验, 优化退火温度, 由此建立最佳反应条件, 并最终确定反应参数。

## 1.9 标准曲线绘制及引物扩增效率计算

将 1.7 中系列稀释标准品作为反应模板, 每个梯度设置 5 个重复, 按照所建立的 qRT-PCR 体系和参数进行反应, 由仪器自动绘制标准曲线并生成线性方程和相关系数( $R^2$ ), 根据斜率的线性方程计算引物的扩增效率。利用统计学方法计算各梯度  $C_T$  值的变异系数(CV), 分析其重复性和稳定性。

## 1.10 qRT-PCR 的灵敏性检测

在 1.7 中标准品质粒 10 倍系列稀释基础上, 进一步制备了 50、25 和 12.5 copies/ $\mu\text{L}$  标准品质粒。将倍比稀释质粒作为模板进行 qRT-PCR, 通过分析  $C_T$  值变异系数, 确定该方法的检测极限值。

## 1.11 qRT-PCR 特异性检测

为分析该检测方法的特异性, 以携带 MCRV 鳃组织样本作为阳性对照, 以健康青蟹鳃组织 cDNA 样本作为阴性对照, 使用甲壳类常见病原核酸样本, 如 MCDV 的 cDNA 以及 WSSV、DIV1、EHP 或副溶血弧菌的 DNA, 进行 qRT-PCR, 分析该检测方法的特异性。

## 1.12 MCRV 感染情况调查

为评估 MCRV qRT-PCR 检测方法的实用性、了解 MCRV 感染状况, 使用该检测方法对来自海南的 22 只种蟹和浙江的 20 只商品青蟹分别进行 MCRV 检测。

## 1.13 MCRV 在青蟹体内的增殖模式分析

从上海某养殖场购买的青蟹经检测无 MCRV 感染后, 挑选规格大体一致的健康青蟹 6 只(约 250 g/只), 用于病毒感染实验, 实验水温设为 21  $^{\circ}\text{C}$ 。按照熊娟(2011)的方法制备病毒粗提液, 并将 200  $\mu\text{L}$  病毒粗提液从步足基部注入实验组青蟹体内。分别在病毒感染 0、24、48、72、96、120、144、168 和 192 h 时抽取少量血淋巴(约 50  $\mu\text{L}$ /只)提取 RNA, 用于分析病毒相对含量。病毒感染期间, 统计青蟹死亡情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 MCRV 在感染青蟹的血淋巴和鳃中含量最高

MCRV 在感染青蟹各组织中的相对含量见图 1, 病毒分布于所有检测组织中, 其中, 血淋巴和鳃组织中的病毒含量显著高于其他组织, 病毒相对含量平均值由高到低依次为血淋巴、鳃、肠、心脏、胃、肝胰腺和肌肉。实验结果提示, 以血淋巴作为 MCRV 检测的采样组织, 能提高检测方法的灵敏性。

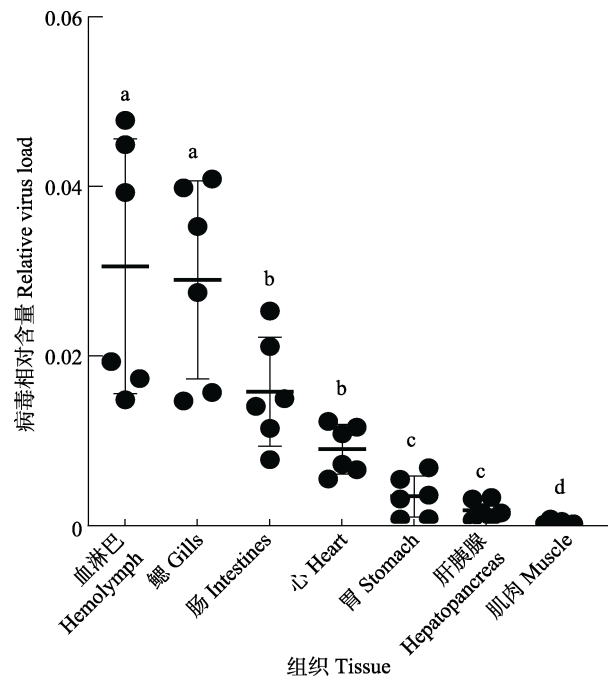


图 1 MCRV 的组织分布

Fig.1 Relative load of MCRV in different tissues

不同字母表示组间差异显著。下同。

Different letters indicate significant differences among groups. The same as below.

### 2.2 病毒 *VP11* 基因表达水平最高

MCRV 是具有合成 mRNA 能力的双链 RNA 病毒, 为分析病毒各基因相对表达量(含基因组序列), 实验使用随机引物对血淋巴总 RNA 进行反转录, 合成病毒及其转录本 cDNA 作为基因表达量分析的模板。以病毒基因特异引物(13 对引物)和内参基因引物分别检测各基因的相对表达量。结果显示, 在 MCRV 感染过程中, 各基因表达存在显著差异(图 2)。其中, *VP11* 基因相对表达量的平均值最高, 显著高于其他多数基因。研究结果提示, 以 *VP11* 基因序列设计引物进行病毒检测, 能显著提高检测灵敏性。

### 2.3 含 VP11 基因片段标准品质粒的制备

以 MCRV 的 VP11 cDNA 作为模板, 使用引物 MCRVVPF1 和 MCRVVPR1 进行 PCR 扩增, 获得 1 条约 725 bp 的条带, 大小与预期目的片段相符(图 3)。插入该片段的 pMD19-T 载体经测序后, 发现克隆序列与原序列一致。经检测, 提取的标准品质粒 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 值为 1.92, 浓度为 18 μg/μL。质粒全长为 3 417 bp, 由公式换算出标准品拷贝数为 4.8×10<sup>9</sup> copies/μL, 随后, 加灭菌双蒸水将质粒浓度调整为 1.0×10<sup>9</sup> copies/μL。

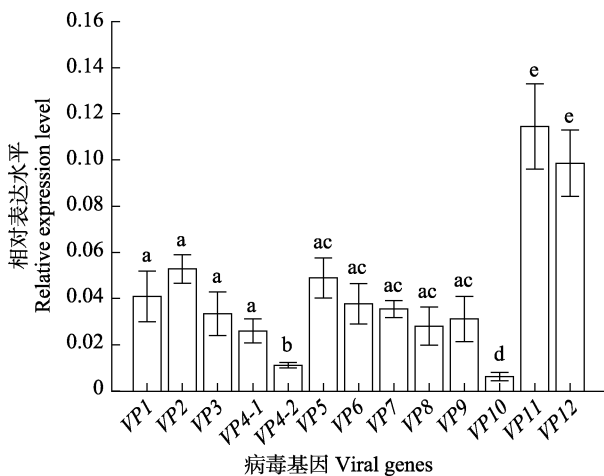


图2 MCRV 13个预测基因在青蟹血淋巴中的相对表达量  
Fig.2 Relative expression level of 13 predicted genes of MCRV in the hemolymph of mud crab

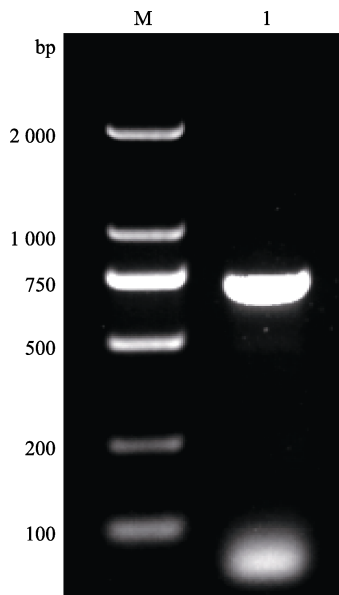


图3 病毒 VP11 基因部分 DNA 片段的扩增  
Fig.3 The partial DNA fragment of VP11 obtained by PCR

M: DNA Marker; 1: 扩增的 VP11 DNA 片段。

M: DNA Marker; 1: The amplified VP11 DNA fragment.

### 2.4 SYBR Green qRT-PCR 体系确立

使用不同浓度引物进行正交实验, 当引物 MCRVV11RF 和 MCRVV11RR 的终浓度均为 2 μmol/L 时, 检测样品可获得较小的 C<sub>T</sub> 值和更强的荧光信号强度。同时, 对扩增产物的熔解度曲线进行分析, 只在 81.5 °C 附近出现单峰, 说明该引物为特异性扩增(图 4A)。经过实验优化, 确定 qRT-PCR 体系为 20 μL: TB Green II 10 μL; ROX 参比染料 0.4 μL; 上、下游引物各 0.4 μL (10 μmol/L); 无菌水 6.8 μL; cDNA 模板 2 μL。反应参数: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 读板 1 次, 共 40 个循环; 最后, 将温度从 60 °C 提高到 95 °C, 期间每增加 0.5 °C 检测 1 次荧光值。

### 2.5 引物扩增效率计算和数据重复性分析

采用 1×10<sup>9</sup>、1×10<sup>8</sup>、1×10<sup>7</sup>、1×10<sup>6</sup>、1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>3</sup>、1×10<sup>2</sup>、5×10<sup>1</sup> copies/μL 的质粒模板绘制标准曲线。实验结果如图 4B 所示, 线性方程为 C<sub>T</sub> = -3.346X+37.12 (X 为质粒拷贝数的对数), 相关系数 R<sup>2</sup>=0.997, 说明标准曲线具有良好的线性关系。基于标准曲线计算引物扩增效率为 99.0%, 处于最优范围内(95%~105%)。统计分析得到 C<sub>T</sub> 值变异系数(CV)处于 0.2%~1.5%之间, 说明该检测方法重复性好、稳定性高(表 2)。

### 2.6 敏感性和特异性分析

从图 5A 可以看出, 以标准品质粒为模板时, 所有反应均能有效扩增, 得到良好的“S”型扩增曲线, 质粒浓度为 50 copies/μL 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, 表明该检测方法可用于纯品病毒粒子的绝对定量, 灵敏度高达 50 copies/反应。当质粒浓度为 25.0 和 12.5 copies/μL 时, 检测值已非线性, 已不适于样品的绝对定量。尽管如此, 这 2 个梯度质粒样品都能获得“S”型扩增曲线, 表明仍可用于病毒的定性检测, 灵敏度达 12.5 copies/反应(图 5B)。

此外, 使用含 MCDV、WSSV、DIV1、EHP 和副溶血弧菌核酸的样品均未出现可见的扩增曲线, 说明该检测方法特异性强, 不会因上述病原混合感染或存在而影响 MCRV 检测结果(图 6)。

### 2.7 筛选无 MCRV 种蟹和病原检测

抽取来自海南的 22 只种蟹的微量血淋巴进行检测, 其中, 12 只呈 MCRV 阳性, 感染率为 54.55%; 对无 MCRV 感染的 10 只健康种蟹进行培育, 后期均

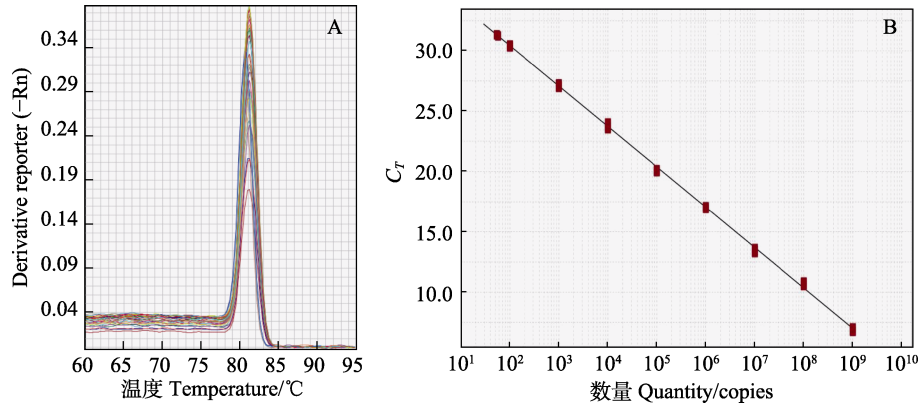


图 4 qRT-PCR 产物溶解曲线(A)及标准曲线(B)

Fig.4 Melting curves (A) of qRT-PCR amplified target DNA fragments and a standard curve (B)

表 2 MCRV 标准品质粒的  $C_T$  值和变异系数

Tab.2 The  $C_T$  values and CVs obtained with MCRV standards and coefficient of variation

模板数量 No. of plasmid /(copies/ $\mu$ L)	平行检测样品 $C_T$ 值 $C_T$ values of parallel tests					平均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV
	1	2	3	4	5			
$1 \times 10^9$	6.993	6.726	6.710	6.673	6.646	6.750	0.097	0.014
$1 \times 10^8$	10.792	10.993	10.489	10.788	10.620	10.736	0.145	0.014
$1 \times 10^7$	13.540	13.202	13.102	13.307	13.324	13.295	0.114	0.009
$1 \times 10^6$	17.726	17.016	16.967	16.862	16.954	17.105	0.248	0.015
$1 \times 10^5$	20.013	20.066	19.957	19.951	19.907	19.979	0.049	0.002
$1 \times 10^4$	24.169	23.954	24.157	23.589	24.080	23.990	0.175	0.007
$1 \times 10^3$	27.242	26.938	27.463	26.917	27.160	27.144	0.173	0.006
$1 \times 10^2$	30.411	30.001	30.306	29.869	30.240	30.165	0.184	0.006
$5 \times 10^1$	31.154	31.234	30.224	31.562	30.716	30.978	0.406	0.013

实现了抱卵和孵化。上述结果表明,该检测方法可用于筛选无 MCRV 种蟹,且从种蟹抽取少量血淋巴并不影响后期抱卵和孵化。此外,对购自浙江某养殖场的 20 只商品蟹进行检测,感染率为 85.00%,表明该检测方法能满足青蟹病原感染情况调查的需要。

### 2.8 MCRV 在青蟹体内的增殖模式

MCRV 感染健康青蟹后,病毒呈指数级增殖,24 h 时即可检测到病毒,120 h 时病毒增殖进入平台期,病毒的增殖速度开始减慢,此后,病毒含量稍有增加后开始呈现下降趋势(图 7)。整个感染周期内未出现青蟹死亡。

## 3 讨论

目前 MCRV 感染较为普遍,严重影响了青蟹养殖产业的健康发展。为从源头限制该病原感染和传播,本研究开发了一种用于筛选无 MCRV 种蟹的 qRT-PCR 检测方法。该方法选择病毒含量最高的组织进行样品采集,以病毒表达水平最高基因为靶标序列设计特异引物,具有损伤低、灵敏性高和实用性强的

特点,能满足在微创条件下筛选无 MCRV 种蟹的需要,也可应用于病原检测和感染相关研究。

目前已经建立的 MCRV 检测方法主要是通过提取鳃或肝胰腺 RNA 进行病原检测。这类检测方法通常需要杀死青蟹来获得组织样品,并且需要随机挑选青蟹,根据检测结果评估青蟹群体携带病毒情况。因此,这类检测方法显然不适用于无 MCRV 种蟹筛选。为获得一种适合筛选无 MCRV 种蟹的病毒检测方法,本研究首先分析了 MCRV 在感染青蟹中的组织分布特点,发现病毒感染青蟹中血淋巴和鳃组织病毒含量显著高于其他组织,并且血淋巴中病毒含量的平均值稍高于鳃组织中病毒含量的平均值。需要注意的是,血细胞中病毒含量低于血淋巴中病毒含量(未发表数据)。这提示病毒感染青蟹无血细胞(cell-free)血淋巴中也存在大量的病毒粒子。本研究通过抽取含毒量最高的血淋巴组织进行 RNA 抽提,并应用于 MCRV 检测,提高了检测的灵敏性。同时,由于这种方法抽取血淋巴数量很少,可低至 20  $\mu$ L,几乎不损伤青蟹个体,显著降低了经济损失并提高了检测效率。

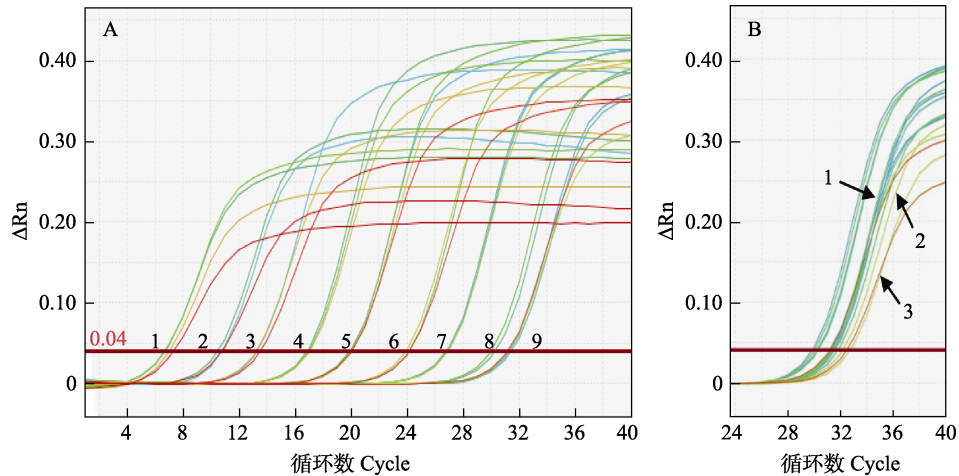


图5 qRT-PCR 扩增曲线和检测灵敏性分析

Fig.5 The qRT-PCR amplification curves and detection sensitivity analysis

A 图中 1~9 号标准品质粒浓度依次为  $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$  和  $5 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L。

B 图中 1~3 号标准品质粒浓度为 50、25 和 12.5 copies/ $\mu$ L，该检测方法检测极限可达 12.5 copies/ $\mu$ L。

In panel A, the numbers of MCRV standard plasmids in samples 1~9 are  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$  and  $5 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L, respectively. In panel B, the numbers of the template are 50, 25 and 12.5 copies/ $\mu$ L, respectively. The minimum detection limit of this method is 12.5 copies/ $\mu$ L.

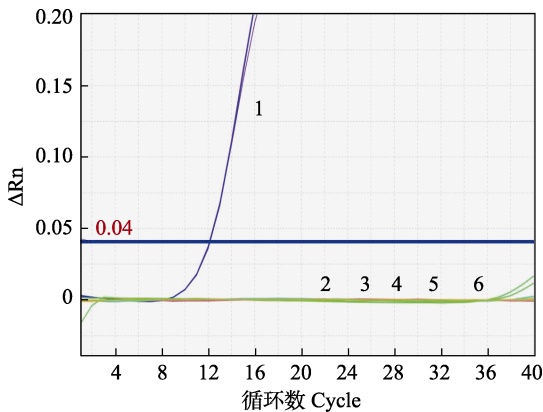


图6 MCRV 特异性检测实验结果

Fig.6 The results of MCRV-specific assay for primers used in qRT-PCR

- 1: MCRV 阳性样品; 2: 青蟹双顺反子病毒;
- 3: 白斑综合征病毒; 4: 十足目虹彩病毒 1;
- 5: 虾肝肠胞虫; 6: 副溶血弧菌

1: MCRV-positive control; 2: The cDNA sample from MCDV-infected gills of mud crab; 3~5: The DNA samples from WSSV, DIV1 and EHP; 6: *V. parahemolyticus*

前期研究预测 MCRV 的 12 个基因组节段可编码 13 个蛋白,即病毒感染过程中至少表达了 13 个基因。通过分析这 13 个基因的表达水平,发现基因间表达水平存在显著差异,其中 *VP11* 基因表达量最高。据报道,*VP11* 为病毒的外衣壳蛋白(熊尚凌等, 2017),且与已报道的 *SsRV* 毒株相比,*VP11* 序列非常保守。考虑到该外衣壳蛋白基因序列与数据库中其他序列

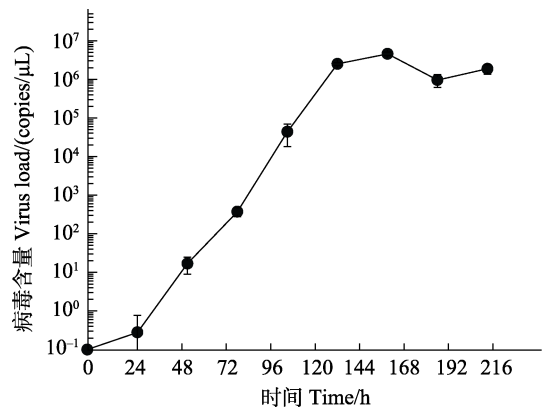


图7 MCRV 在青蟹血淋巴中增殖趋势(n=6)

Fig.7 The number of MCRV in hemolymph of mud crab (n=6)

相似性很低,认为 *VP11* 很适合作为靶标序列设计 MCRV 的检测引物。目前, MCRV 检测引物主要是基于 *VP1* (RNA 聚合酶)基因序列,由于 *VP11* 基因的表达量显著高于 *VP1* 基因,因此,在理论上基于 *VP11* 基因序列的检测方法的灵敏性要高于其他检测方法。

由于非特异扩增及环境中核酸样品污染导致的假阳性是目前病原检测难以克服的技术痛点之一。基于 SYBR Green 染料法建立的 qRT-PCR 检测方法,内设 PCR 产物解曲线分析程序,可根据熔点判断是否非特异性扩增以及样品是否存在核酸污染,这是该检测方法最大的技术优势。由于 SYBR Green 染料自身条件的限制(背景较高),其检测灵敏性稍低于 TaqMan 探针法,但是通过优化引物设计,将本研究

建立的检测方法的灵敏性提高到了 50 copies/反应(定量检测),达到基于 SYBR Green 染料建立检测方法的理想水平。此外,使用该检测方法对常见甲壳类病毒感染组织的核酸样品(MCDV、WSSV、DIV1 及 EHP)进行检测,均未出现特异性扩增,仅有 MCRV 阳性样品出现特异扩增曲线,表明该检测方法特异性强,适用于多种常见病原混合感染样品检测。最后,使用 SYBR Green 染料建立的 qRT-PCR 检测方法操作简单、成本更低,很适合开展大批量样品病原检测。

为检验该检测方法的使用效果,分别对 22 只种蟹和 20 只商品蟹进行 MCRV 检测,阳性率分别为 54.55%和 85.00%,表明该病毒感染在青蟹中已非常普遍,养殖商品青蟹感染率与申亚阳等(2017)检测结果相似。值得注意的是,该检测方法只抽取了少量血淋巴,并未造成青蟹死亡,并且挑选的健康青蟹都完成了抱卵与孵化,提示该检测方法可应用于筛选无 MCRV 种蟹,在青蟹良种场建设方面具有很好的应用前景。此外,我们还使用建立的检测方法成功挑选了无 MCRV 青蟹,并在此基础上分析了 MCRV 在青蟹体内的增殖模式。发现病毒在血淋巴中的增殖模式与早期研究结果类似(熊娟, 2011),但本研究中病毒增殖达到平台期的时间更长,且未造成青蟹死亡。这很可能与实验水温较低有关,较高的温度更容易导致病毒快速增殖和青蟹死亡。当然,也可能是当前毒株毒力减弱造成的,毕竟该病毒从首次报道至今已 10 余年,感染更为普遍,且致死率有所降低。因此,后续有必要对该病毒基因组重测序,分析毒力变化分子机理。

此外,考虑到 dsRNA 制备相对复杂且易降解等问题,本研究并未选择 dsRNA 作为标准品,而是选择了更易制备和定量的质粒(dsDNA)。与前者相比,虽然质粒做模板缺少了反转录过程,但并不影响对引物扩增效率的计算,而且根据质粒标准品计算的检测灵敏度在理论上与反转录效率为 100%时一致,其能较真实反映该检测方法的灵敏度。因此,其他 RNA 病毒也常采用质粒作为标准品(崔亚婷, 2015; 李天芝等, 2015; 谢守玉等, 2021)。

#### 4 结论

本研究建立了一种灵敏性高且实用的 MCRV qRT-PCR 检测方法。该方法能满足在微创条件下筛选无 MCRV 种蟹的需要,在青蟹良种场建设和无 MCRV 青蟹苗种生产方面具有很好的应用前景。此外,该检测方法也可应用于实验室中 MCRV 感染机制的研究。

#### 参 考 文 献

- CAI X H, PENG Y H, LIU X J, *et al.* The pathogenicity of mud crab reovirus (MCRV) to green crab *Scylla paramamosain*. *Fisheries Science*, 2013, 32(3): 130–135 [蔡小辉, 彭银辉, 刘旭佳, 等. 青蟹呼肠孤病毒对拟穴青蟹的致病性研究. *水产科学*, 2013, 32(3): 130–135]
- CHEN J G, XIONG J, CUI B J, *et al.* Molecular characterization of eight segments of *Scylla serrata* reovirus (SsRV) provides the complete genome sequence. *Archives of Virology*, 2012, 157(8): 1551–1557
- CHEN J G, XIONG J A, YANG J F, *et al.* Nucleotide sequences of four RNA segments of a reovirus isolated from the mud crab *Scylla serrata* provide evidence that this virus belongs to a new genus in the family Reoviridae. *Archives of Virology*, 2011, 156(3): 523–528
- 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]
- LEE C, KIM J, SHIN S G, *et al.* Absolute and relative qPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2006, 123(3): 273–280
- LI T Z, YU X Y, WANG J L, *et al.* Development of SYBR Green I real-time PCR assay for detection of Avian reovirus. *Poultry Science*, 2015(10): 10–14 [李天芝, 于新友, 王金良, 等. 禽呼肠孤病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立. *家禽科学*, 2015(10): 10–14]
- LI X C, ZHOU J F, FANG W H, *et al.* Development and application of an economical real-time PCR for WSSV detection and quantification in ridgetail white prawns (*Exopalaemon carinicauda*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(10): 1554–1562 [李新苍, 周俊芳, 房文红, 等. 实用 WSSV 定量检测方法的建立及其应用于脊尾白虾病毒感染规律的研究. *水产学报*, 2012, 36(10): 1554–1562]
- LIANG H, GENG J, BAI S, *et al.* TaqMan real-time PCR for detecting bovine viral diarrhea virus. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2019, 22(2): 405–413
- REKHVIASHVILI N, STEVENS G, SCOTT L, *et al.* Fluorogenic LUX primer for quantitation of HIV-1 by real-time RT-PCR. *Molecular Biotechnology*, 2006, 32(2): 101–109
- SANG S W, LI X P, ZHANG Q L. Establishment and application of the TaqMan RT-PCR detection method for the shrimp movement disorder *Nodavirus* (MDNV). *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(5): 77–85 [桑松文, 李小平, 张庆利. 虾类行动障碍野田村病毒(MDNV) TaqMan RT-PCR 检测方法的建立与应用. *渔业科学进展*, 2021, 42(5): 77–85]
- SHEN Y Y, YANG K, MA H L, *et al.* Molecular epidemiological



- investigation of the mud crab reovirus and mud crab dicistrovirus-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]
- SONG Z L, DONG X, ZHAO R H, *et al.* Evaluation on the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in pooled DNA samples of *Litopenaeus vannamei* based on TaqMan qPCR. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 122–132 [宋增磊, 董宣, 赵若恒, 等. 基于 TaqMan qPCR 检测凡纳滨对虾样品中虾肝肠胞虫并样检测方法的评价. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 122–132]
- 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
- XIE S Y, LIU H X, YIN Y W, *et al.* Establishment and clinical application of multiplex TaqMan real-time RT-PCR for differential detection of DTMUV, NDRV and MDRV. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43(9): 952–958 [谢守玉, 刘惠心, 尹彦文, 等. 鸭坦布苏病毒、新型鸭呼肠孤病毒及番鸭呼肠孤病毒多重 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与临床应用. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(9): 952–958]
- 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]
- XIONG S L, XING J L, FAN D Y, *et al.* Mapping interactions of *Scylla serrata* reovirus in five structural proteins. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(5): 1108–1113 [熊尚凌, 邢峻梁, 范东洋, 等. 锯缘青蟹(*Scylla serrata*)呼肠孤病毒 5 个结构蛋白互作分析. *海洋与湖沼*, 2017, 48(5): 1108–1113]
- ZHANG D, SU Y L, FENG J, *et al.* Survey on infection of two viruses in the wild mud crab (*Scylla paramamosain*) in Yangjiang, Guangdong Province. *South China Fisheries Science*, 2013a, 9(5): 137–141 [张迪, 苏友禄, 冯娟, 等. 广东省阳江地区野生拟穴青蟹 2 种病毒感染情况调查. *南方水产科学*, 2013a, 9(5): 137–141]
- ZHANG D, YANG K, SU Y L, *et al.* A duplex nested-PCR assay for detection of mud crab reovirus and mud crab dicistrovirus-1. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013b, 20(4): 808–815 [张迪, 杨铿, 苏友禄, 等. 青蟹呼肠孤病毒和青蟹双顺反子病毒-1 双重巢式 PCR 检测方法的建立. *中国水产科学*, 2013b, 20(4): 808–815]
- ZHENG T L. A review of research progresses of diseases in mud crab *Scylla paramamosain*. *Fisheries Science*, 2014, 33(5): 326–330 [郑天伦. 拟穴青蟹病害研究进展. *水产科学*, 2014, 33(5): 326–330]

(编辑 马瑾艳)

## A New SYBR Green qRT-PCR Diagnostic Method for Screening MCRV-Free Breeding Mud Crabs

CHU Xu<sup>1,2</sup>, FANG Wenhong<sup>2</sup>, LIU Zhiqiang<sup>2</sup>, ZHOU Junfang<sup>2</sup>, LI Xinshu<sup>1①</sup>, LI Xincang<sup>2①</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Key Laboratory of East China Sea Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

**Abstract** Mud crab reovirus (MCRV) is one of the most fatal pathogens of the mud crab *Scylla paramamosain*. The outbreak and epidemic of MCRV has seriously affected the healthy development of the mud crab aquaculture industry. To limit MCRV transmission from breeding crabs to larva, we attempt to establish a more sensitive and practical diagnostic method for screening MCRV-free crabs. The primers of the present diagnostic methods for MCRV are based on the *VPI* gene (MCRV RNA polymerase gene), and the low expression level of this gene limits the sensitivity of the diagnostic method. Therefore, it is necessary to select the target gene with the highest expression level for the detection primer to improve

① Corresponding author: LI Xinshu, E-mail: xinshul@sina.com; LI Xincang, E-mail: lixin8687@163.com

the sensitivity of the diagnostic method. In addition, the current diagnostic methods require gill samples for virus detection, which requires killing the mud crabs before sampling. This sampling method is obviously not suitable for screening MCRV-free breeding crabs. Therefore, it is necessary to develop a less invasive sampling method for breeding crabs. In this study, a SYBR Green fluorescent quantitative diagnostic method was developed to screen MCRV-free breeding crabs. To improve the sensitivity of the detection, we initially analyzed the relative load of MCRV in the main tissues of infected mud crabs. The viral load in the hemolymph was the highest of all the tissues. The expression levels of 13 putative genes of MCRV were detected in the hemolymph. The relative expression level of the *VP11* gene was the highest. Finally, specific primers were designed based on the conserved region of the *VP11* gene sequence to establish a SYBR Green qRT-PCR (quantitative reverse-transcription PCR) detection method to accurately detect 50 copies/ $\mu\text{L}$  of viral nucleic acid in a sample. Considering the advantages of tissue and target gene selection, the sensitivity of this method should be significantly higher than that of preexisting detection methods. This diagnostic method is very specific for MCRV and no specific amplification was observed using nucleic acid samples containing 5 different kinds of common crustacean pathogens (MCDV, WSSV, DIV1, EHP, and *Vibrio parahaemolyticus*). Compared to other methods of extracting RNA by killing and grinding the gill tissues of crabs, we can select MCRV-free crabs by sampling very small amounts of hemolymph (as low as 20  $\mu\text{L}$ ). All of the healthy crabs screened by this method were able to hold eggs that hatched normally. To test the effectiveness of this method, 22 breeding crabs and 20 commercial crabs were screened for MCRV. The positive rates were 54.55% and 85.00%, respectively. In addition, we analyzed the proliferation of MCRV in the mud crabs, and found that MCRV proliferates exponentially in the early stage, then enters a plateau phase, and no crabs died during the infection period of seven days. In conclusion, this study established a highly-sensitive and practical detection method for MCRV in breeding crabs, which can meet the requirements for MCRV-free breeding crab screening with low damage to the breeders. We also investigated the pathogenic infection mechanisms.

**Key words** MCRV; Diagnostic method; Breeding mud crab (*Scylla paramamonsain*); qRT-PCR