

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00808

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

张迪^{1,2}, 杨铿¹, 苏友禄¹, 冯娟¹, 郭志勋¹

1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所 农业部水产品加工重点实验室, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 青蟹呼肠孤病毒(mud crab reovirus, MCRV)和青蟹双顺反子病毒-1(mud crab dicistrovirus-1, MCDV-1)是从近年发生大规模死亡的养殖拟穴青蟹体内分离的、对青蟹具有致病性的两种病毒。它们常常同时存在,给青蟹养殖业带来巨大经济损失。在疾病的防治中,快速高效的病毒检测方法对疾病诊断以及及时采取有效地防治措施具有重要的意义。本研究利用 MCRV 和 MCDV-1 基因保守区设计 4 对引物,建立了可同时检测这两种病毒的双重巢式 PCR(duplex-nested PCR)检测方法。研究发现该方法对两种病毒的检测限都可以达到 10 个拷贝,并与鲍肌肉萎缩病毒(AbSV)、虾类传染性表皮与造血组织坏死症病毒(IHHNV)、大菱鲆红体病虹彩病毒(TRBIV)、对虾白斑综合症病毒(WSSV)、鱼类神经坏死病毒(NNV)和贝类急性病毒性坏死症病毒(AVNV)等水生动物常见病毒均无交叉反应,可以特异性地检测两种病毒。本方法具有高灵敏度、高特异性和简便快捷等特点,可作为一种快速诊断工具,检测拟穴青蟹中的 MCRV 和 MCDV-1 基因。

关键词: 拟穴青蟹; 青蟹呼肠孤病毒; 青蟹双顺反子病毒-1; 双重巢式 PCR

中图分类号: S945

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)04-0808-08

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)(原被鉴定为锯缘青蟹(*Scylla serrata*)^[1])是中国东南沿海地区重要的海水养殖种类,2010 年全国总产量达到了 11.6 万 t^[2]。但随着养殖规模的逐步扩大,不良环境因子、细菌、寄生虫、病毒等因素导致青蟹病害问题不断严重^[3]。

2004 年开始在福建、广东等多个省份发生的养殖青蟹“嗜睡病”,死亡率接近 70%^[4]。从患“嗜睡病”的青蟹中分离到两种病原:一种是青蟹呼肠孤病毒(mud crab reovirus, MCRV)^[5],亦称锯缘青蟹呼肠孤病毒(*Scylla serrata* reovirus, SsRV)^[6];另一种是青蟹双顺反子病毒(mud crab dicistrovi-

rus-1, MCDV-1)^[7-9],2012 年被国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)正式命名为青蟹病毒(Mud Crab Virus)^[10]。人工感染这两种病毒的青蟹死亡率均达到 100%^[5,9]。“嗜睡病”流行性广、导致的死亡率高、危害严重,极大地限制了拟穴青蟹养殖业的发展。

目前已报道的 MCRV 检测方法有巢式逆转录 PCR(nRT-PCR)法^[11]、反转录环介导等温扩增技术(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay, RT-LAMP)^[12]等。这两种方法检出结果准确可靠,但只能检测一种病原,在混合感染检测中存在一定的局限性。因此,建立快速、

收稿日期: 2012-12-07; 修订日期: 2013-03-09.

基金项目: 广东省科技计划项目(2011A020102002); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201001H04); 广东省教育部产学研结合项目(2010B090400519); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助(2012TS06).

作者简介: 张迪(1987-),女,硕士研究生,主要从事青蟹养殖病害研究. E-mail: zhangdi15@yahoo.com.cn

通信作者: 郭志勋,研究员. E-mail: guozhixu1@163.com

简便、灵敏的病毒检测技术非常必要。多重 PCR 技术可用于这种混合感染的检测和鉴定^[13-15], 并节省了成本和时间。但这项技术的灵敏度有限, 结合巢式 PCR 技术可使其检测下限提高几个数量级, 基本可以满足实际工作的需求。本研究依据 *MCRV* 和 *MCDV-1* 基因组保守区各设计两对引物, 建立针对这两种病毒的特异性双重巢式 PCR 检测方法, 并进行初步应用, 以期实现对青蟹病毒的快速检测和监控。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用自然发病蟹与健康蟹分别采自广东省阳江市和陆丰市的拟穴青蟹养殖场。野生蟹采自广东省阳江市港口。

1.2 引物设计

以 *MCRV*(GenBank 登录号: HQ414137.1)和 *MCDV-1* (GenBank 登录号: HM777507.1) 基因组保守区核酸序列为基础, 利用引物设计软件 Primer Premier 5.0, 各设计两对引物, 分别作为双重巢式 PCR 的内外引物对, 并由 Invitrogen 公司合成。引物序列参见表 1。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

采用 Trizol(RNAiso™ Plus, TaKaRa)试剂提取健康蟹、病蟹鳃组织的总 RNA。利用随机引物将所得总 RNA 反转录成 cDNA, -20℃ 保存备用。

1.4 PCR 反应体系

巢式 PCR 两次扩增的反应体积均为 20 μL, 反应体系为: 2 x PCR Mix(东胜生物)预混合液 8 μL, 上、下游引物加入量为 0.4~0.8 μL(10 μmol/L,

共 2 对), 0.2~1 μL 模板, 加灭菌超纯水至 20 μL。扩增程序为: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 扩增 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。先使用外引物 MR/MD 进行一扩, 再将一扩产物作为模板, 使用内引物 MRN/MDN 进行巢式 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳读取检测结果。

1.5 双重巢式 PCR 反应条件的优化

1.5.1 引物比例 为筛选出双重巢式 PCR 反应中引物配比的水平, 设计如下引物浓度组合方案(表 2)以获取最佳外、内引物浓度比。筛选标准为两种病毒在同一体系中都能获得较好且一致的扩增效率。

1.5.2 PCR 退火温度 在试验确定的引物最佳组合基础上, 优化本试验中所用引物的退火温度。设置退火温度为 49~60℃, 选取两种病毒都能获得较好且一致的扩增效率时的温度为最适退火温度。

1.6 灵敏度试验

将制备的两种病毒的标准重组质粒调整至同等浓度(即 1×10^9 copies/μL), 再按照 10 倍浓度进行系列稀释。取浓度为 $10^7 \sim 10^{-1}$ copies 作为模板, 按照优化后的反应体系进行双重巢式 PCR 灵敏度试验。同时, 进行内引物双重 PCR 灵敏度试验作为对比。

1.7 特异性试验

用于特异性试验的鲍肌肉萎缩病毒(abalone shriveling syndrome-associated virus, AbSV)、传染性表皮与造血组织坏死症病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)、大菱鲆

表 1 用于青蟹呼肠孤病毒和青蟹双顺反子病毒-1 检测的 PCR 引物序列
Tab. 1 Nucleotide sequence of primers used for *MCRV* and *MCDV-1* detection

病毒 virus	引物名称 primer		引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	PCR 产物/bp size of PCR product
<i>MCRV</i>	MR(外引物) outer primer	ReoF ReoR	GCAAATTGAACTACTACTACTTA GATTCCTATTGTCAACTATCTCA	433
	MRN(内引物) inner primer	ReoNF ReoNR	ACTCATAGAGCAGTCATGGG ATATCGTCAGAATGTCGTTTC	304
	MD(外引物) outer primer	DicF DicR	GCACTGGGTACTCTTCCTG ACACCTACCAAAGCCCTAC	686
	MDN(内引物) inner primer	DicNF DicNR	GGATACTATGGATGATGTTTC ACAAAATACCAGATAAAGCAA	404

红体病虹彩病毒(turbot viral reddish body iridovirus, TRBIV)、对虾白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)、急性病毒性坏死征病毒(acute virus necrobiotic virus, AVNV)的 DNA 和神经坏死病毒(nervous necrosis NNV)的 cDNA 均为本实验室保存。MCRV 与 MCDV-1 双阳性 cDNA 模板来自阳江养殖蟹阳性病例, 阴性对照 cDNA 模板由陆丰养殖健康蟹鳃组织制备而成。以蒸馏水做模板设置空白对照, 采用优化后的双重巢式 PCR 反应验证本检测方法的特异性。

1.8 检测方法的应用

以本试验建立的双重巢式 PCR 检测方法对发病蟹和野生蟹进行检测。5 只发病蟹来自 2011 年 7 月阳江养殖场送检病样, 22 只阳江野生蟹于 2012 年 7 月购自广东省阳江市港口。以重组质粒为阳性对照, 蒸馏水为空白对照。

2 结果与分析

2.1 双重巢式 PCR 反应体系的优化

2.1.1 引物组合设计 如图 1a 所示, 外引物浓度组合泳道 13 中, 两条带亮度一致且扩增效率最

高。即 MR 和 MD 组合为 0.5 μmol/L 和 0.2 μmol/L 时(表 2), 为最适比例。如图 1b 所示, 内引物组合泳道 11、15、16 既条带一致且扩增效率较高。即 MRN 和 MDN 组合分别为 0.4 μmol/L 和 0.4 μmol/L、0.5 μmol/L 和 0.4 μmol/L、0.5 μmol/L 和 0.5 μmol/L 时, 为最适比例(表 2)。

2.1.2 退火温度 如图 2 a 所示, MD 在各退火温度下扩增效率基本一致, 而 MR 在泳道 5(55.2℃)显示最亮目的片段, 因此, 将 55℃作为双重巢式 PCR 一扩反应的最适退火温度。而 MRN 和 MDN 均在泳道 4(53.1℃)显示一致的最亮片段(图 2b), 即 53℃为双重巢式 PCR 二扩反应的最适退火温度。

2.1.3 优化后的双重巢式 PCR 反应体系 综合前述实验结果, 本检测体系的最佳一扩 PCR 反应体系(20 μL): 2×PCR Mix 预混合液 8 μL, 引物 MR 0.5 μmol/L, 引物 MD 0.2 μmol/L, 最适退火温度为 55℃; 最佳二扩 PCR 反应体系(20 μL): 2×PCR Mix 预混合液 8 μL, 引物 MRN 0.4 μmol/L, 引物 MDN 0.4 μmol/L, 最适退火温度为 53℃。

2.2 灵敏度试验

图 3a 显示, 双重巢式 PCR 一扩 MR 和 MD 的

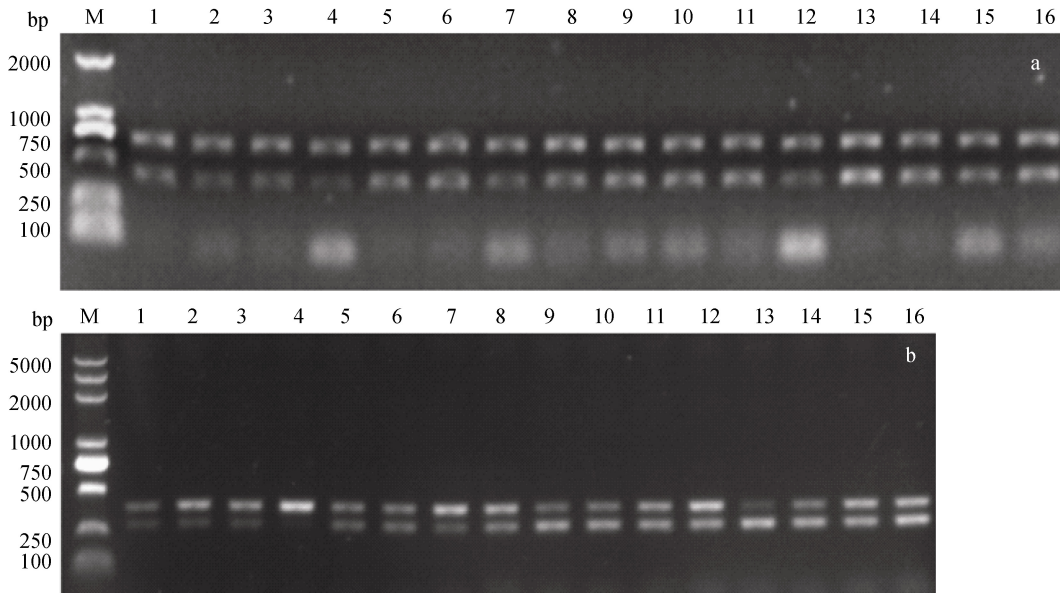


图 1 引物浓度比对双重巢式 PCR 反应的影响

a: 一扩. M: DL2000 DNA 分子量标准; 泳道 1~16: 不同引物组合, 详见表 2. b: 二扩. M: DL2000 plus DNA 分子量标准; 泳道 1~16: 不同引物组合, 详见表 2.

Fig. 1 Effect of primer ratio on duplex nested-PCR amplification system

a: first PCR. M: Marker DL2000; Lanes 1-16: different primer combinations, see Tab. 2. b: nested-PCR. M: Marker DL2000 plus; Lanes 1-16: different primer combinations, see Tab. 2.

表 2 双重巢式 PCR 引物浓度组合
Tab. 2 Combinations of primer concentration in duplex-nested PCR

引物 primer		组合 combination															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
一扩 first PCR	MR	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5
	MD	0.2	0.3	0.4	0.5	0.2	0.3	0.4	0.5	0.2	0.3	0.4	0.5	0.2	0.3	0.4	0.5
二扩 nested-PCR	MRN	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5
	MDN	0.2	0.3	0.4	0.5	0.2	0.3	0.4	0.5	0.2	0.3	0.4	0.5	0.2	0.3	0.4	0.5

注: 组合 1~16 代表图 1 中泳道 1~16。

Note: combinations 1-16 represents lines 1-16 in Fig. 1.

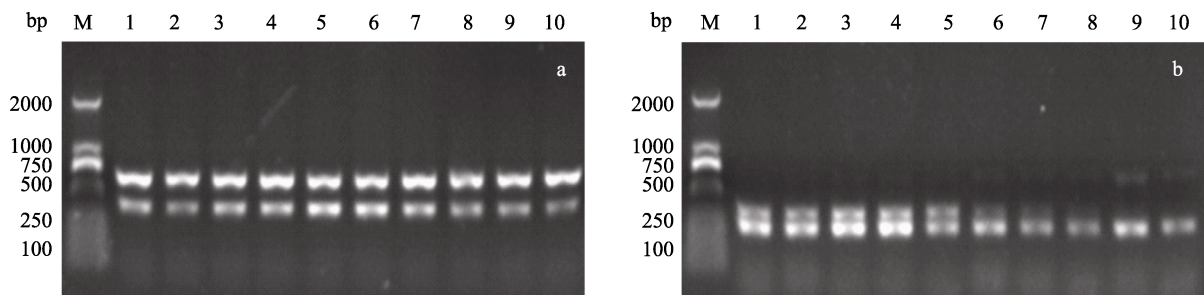


图 2 退火温度对双重巢式 PCR 反应的影响

a: 一扩. b: 二扩. M: DL2000 DNA 分子量标准; 泳道 1~10: 退火温度分别为 49.1、50.0、51.4、53.1、55.2、56.9、58.2、59.1、59.8、60°C 下的扩增效率。

Fig. 2 Effect of annealing temperature on duplex nested-PCR amplification system

a: first PCR. b: nested-PCR. M: Marker DL 2000; Lanes 1-10: 49.1, 50.0, 51.4, 53.1, 55.2, 56.9, 58.2, 59.1, 59.8, 60 °C, respectively.

灵敏度可分别达到 10^5 copies/ μ L 和 10^4 copies/ μ L。图 3b 显示, 仅用内引物对进行灵敏度试验时, MRN 和 MDN 的灵敏度可分别达到 10^5 copies/ μ L 和 10^4 copies/ μ L。图 3c 显示, 将一扩产物 $10^4 \sim 10^{-1}$ copies/ μ L 作为模板进行双重巢式 PCR 二扩反应后, *MCRV* 和 *MCDV-1* 的检测下限都达到了 10 copies/ μ L。

2.3 特异性试验

分别以不同病毒的 DNA 或 cDNA, 与健康蟹和病蟹的 cDNA 一起进行双重巢式 PCR 特异性试验。结果如图 4 所示, 除了感染了 *MCRV* 和 *MCDV-1* 的病蟹出现目的片段, 其他模板均无条带, 表明未发生扩增反应。证实所建立的双重巢式 PCR 检测方法与多种水产常见病毒均无交叉反应, 具有良好的特异性。

2.4 检测方法的应用

应用建立的双重巢式 PCR 方法对 5 份病蟹样品和 22 份野生蟹样品进行检测, 结果见表 3。其

中病蟹样本中两种病毒的阳性率均达到 100% (5/5), 并且在一扩即可检出(图 5)。野生蟹 *MCDV-1* 的检出率在一扩为 4.54% (1/22), 二扩 86.36% (19/22); *MCRV* 检出率在一扩为 27.27% (6/22), 二扩达到 100% (22/22)。

3 讨论

MCRV 和 *MCDV-1* 是从患“嗜睡病”的青蟹中分离的两种病毒, 对青蟹危害严重。快速、灵敏、准确检测出病毒是对病害采取防治措施的前提。目前, *MCRV* 可通过 nRT-PCR 法^[11]和 RT-LAMP 法^[12]进行快速检测, 而 *MCDV-1* 的检测方法迄今尚未见有报道。本研究建立的检测体系, 不但可以快速、准确的检测病毒, 最重要的是在 1 个反应管中, 经过巢式 PCR, 可同时检测、鉴别出 *MCRV* 和 *MCDV-1* 两种病毒且最低可检测到 10 copies 的病毒粒子。

影响多重 PCR 反应的众多因素中, 引物设计

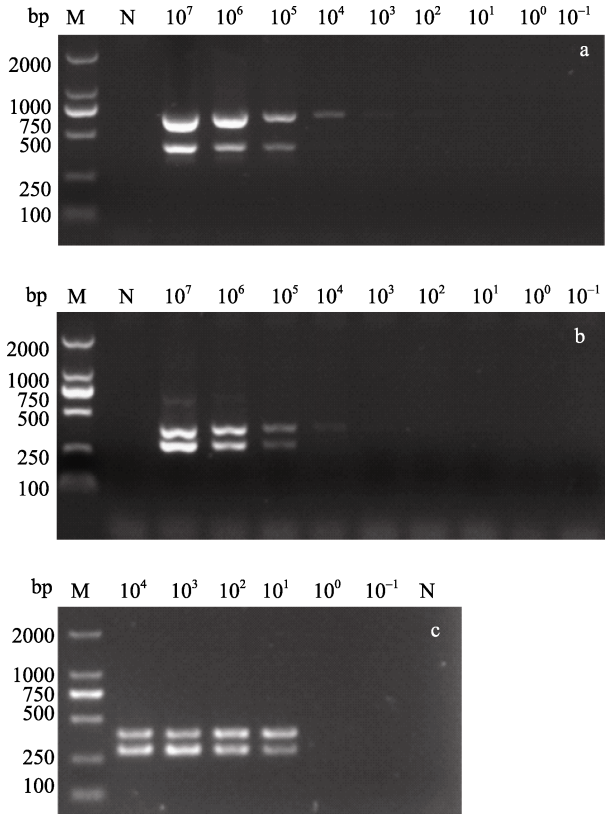


图 3 双重巢式 PCR 内外引物灵敏度试验
a: 外引物检测限; b: 内引物检测限; c: 巢式扩增检测限. M: DL2000 DNA 分子量标准; N: 空白对照; $10^7 \sim 10^{-1}$: 重组质粒浓度(copies/ μ L).

Fig. 3 The sensitivity analysis of duplex nested-PCR
a: the outer primer on duplex PCR; b: the inner primer on duplex PCR; c: nested-PCR. M: Marker DL2000; N: blank control; $10^7 \sim 10^{-1}$: concentrations of plasmid(copies/ μ L).

是最核心的因素^[16-17]。据此, 本研究在引物设计时除了注重特异性好, 避免四对引物之间的二级结构和交互作用外; 还通过控制扩增片段的长度差异(相差在 100~300 bp)来筛选引物。这一筛选基本符合了文献[17]中对目的片段差异范围(30~300 bp)的建议, 使两目的片段即便于琼脂糖凝胶电泳时分辨, 又不至于导致两者的灵敏度相差过大(扩增小片段的 PCR 方法有更高的灵敏度^[18])。此外, 鉴于退火温度对 PCR 扩增的影响最大, 本方法特别筛选出退火温度相同的引物对, 并通过优化获得最佳反应条件以缩小目的片段之间扩增效率的差异, 实现了双重巢式 PCR 的平衡。另外, 引物浓度的比率对于稳定多重 PCR 体系必不可少^[17, 19]。多重 PCR 中一个片段的扩增往往会对另一个片段

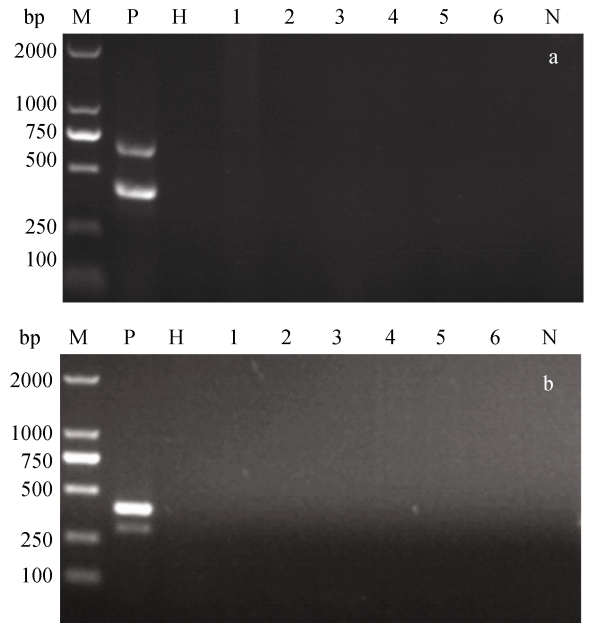


图 4 双重巢式 PCR 特异性试验
a: 一扩; b: 二扩. M: DL2000 DNA 分子量标准; P: 阳性蟹鳃; H: 健康蟹鳃; 1: AbSV; 2: IHNNV; 3: NNV; 4: TRBIV; 5: WSSV; 6: AVNV; N: 空白对照.

Fig. 4 Specificity assay of duplex nested-PCR
a: first PCR; b: nested-PCR; M: Marker DL2000; P: positive control; H: negative control; 1: AbSV; 2: IHNNV; 3: NNV; 4: TRBIV; 5: WSSV; 6: AVNV; N: blank control.

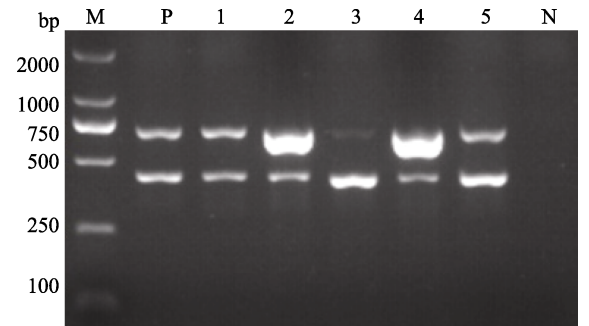


图 5 双重巢式 PCR 检测已感染病毒的拟穴青蟹
M: DL2000 DNA 分子量标准; P: 阳性对照; N: 空白对照; 1~5: 检测的样品.
Fig. 5 Application of duplex nested-PCR in infected mud crab
M: Marker DL2000; P: positive control; N: blank control; 1~5: test samples.

的扩增产生抑制, 调整各引物浓度差异可有效改善该现象^[20]。本实验在 0.2~0.5 μ mol/L 引物浓度范围内优化出外引物对最佳比例为 MR 0.5 μ mol/L 和 MD 0.2 μ mol/L, 内引物对最佳配比浓度为 MNR 0.4 μ mol/L 和 MND 0.4 μ mol/L, 最终

表 3 感染病蟹和野生青蟹样本的检测结果
Tab. 3 duplex nested-PCR results of infected and wild mud crab samples

检测样本 test sample	MCRV 检测结果 positive rate of MCRV		MCDV-1 检测结果 positive rate of MCDV-1		%
	第一轮 PCR (n) first PCR(n)	巢氏 PCR(n) nested-PCR(n)	第一轮 PCR(n) first PCR(n)	巢氏 PCR(n) nested-PCR(n)	
感染病蟹 infected mud crab	100(5)	--	100(5)	--	
野生青蟹 wild mud crab	27.27(22)	100(22)	4.54(22)	86.36(22)	

注: “--”指未进行该检测。

Note: “--”represents the detection was not performed.

有效平衡了每个基因的扩增效率, 使之趋于相同。

多重 PCR 体系因受影响因素较多, 敏感性从 $10^3 \sim 10^7$ copies^[21-23]的情况都存在, 而巢式 PCR 的灵敏度以第二轮扩增为准, 通常在 $10 \sim 10^4$ copies^[18, 21, 24-25]范围内。本研究建立的双重巢式 PCR 对 MCRV 和 MCDV-1 的检测限均达到了 10 个拷贝, 使其灵敏度较一般多重 PCR 提高了 1 000 倍左右, 有效避免了漏检和假阴性结果; 同时比传统巢式 PCR 能够多检测一种病毒, 节省了时间和成本, 是两种技术优势的集合。

已有的研究表明, MCRV 与 MCDV-1 具有伴随存在的现象^[7-9], 而双重巢式 PCR 的建立正好能最直接的观察到该现象。应用性实验中野生青蟹两种病毒的带毒量不高, 但却有 86.36% 的比例为伴随存在(表 3)。疑似发病的 5 例青蟹不仅均为混合感染, 而且两病毒的带毒量差异呈现 3 种特点, 2 例 MCDV 含量较多, 2 例 MCRV 占优势, 1 例两种病毒量均衡(图 5)。笔者猜测这些病蟹病毒量差异可能与青蟹蟹苗来源、病毒感染青蟹时间先后顺序、青蟹个体有关, 但还需要进一步试验以深入了解。

总之, 本实验所建立的双重巢式 PCR 检测体系, 筛选最佳反应条件, 使得操作更加简便, 节省时间, 实验证明具有较高的特异性和敏感性, 可用于 MCRV 和 MCDV-1 的早期同时诊断。为了进一步简化操作步骤, 笔者考虑将逆转录反应结合到双重巢式 PCR 的第一步扩增以缩短检测时间; 并在下阶段将该方法应用于青蟹病毒流行病学调查研究中, 以逐步揭示病毒的发病规律, 做好青蟹养殖的疾病防控工作。

参考文献:

- [1] 林琪, 李少菁, 黎中宝, 等. 中国东南沿海青蟹属(*Scylla*)的种类组成[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 211-219.
- [2] 中国农业部渔业局. 2011 年中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 180.
- [3] Jithendran K P, Poornima M, Balasubramanian C P, et al. Diseases of mud crabs (*Scylla* spp.): an overview[J]. Indian J Fish, 2010, 57(3): 55-63.
- [4] 陈吉刚, 杨季芳, 王海丽, 等. 养殖锯缘青蟹呼肠孤样病毒粒子的电镜观察[J]. 海洋学研究, 2008, 26(4): 93-96.
- [5] Weng S P, Guo Z X, et al. A reovirus disease in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in southern China[J]. J Fish Dis, 2007, 30(3): 133-139.
- [6] 张叔勇, 郑大胜, 白志强, 等. 一株锯缘青蟹呼肠孤病毒的分离纯化及鉴定[J]. 海洋渔业, 2007, 29(3): 277-280.
- [7] Zhang R, He J G, Su H J, et al. Monoclonal Antibodies Produced Against VP3 of a Novel Mud Crab Dicistrovirus[J]. Hybridoma, 2010, 29(5): 437-440.
- [8] Zhang R, He J G, Su H J, et al. Identification of the structural proteins of VP1 and VP2 of a novel mud crab Dicistroviru[J]. J Virolog Meth, 2011, 171: 323-328.
- [9] Guo Z X, He J G, Xu H D, et al. Pathogenicity and complete genome sequence analysis of the mud crab dicistrovirus-1 [J]. Virus Res, 2013, 17(1): 8-14.
- [10] Adams M J, Carstens E B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses[J]. Arch Virol, 2012, 157: 1411-1422.
- [11] Guo Z X, Weng S P, Li G, et al. Development of an RT-PCR detection method for mud crab reovirus[J]. J Virol Methods, 2008, 151(2): 237-241.
- [12] Chen J G, Xiong J, Cui B J, et al. Rapid and sensitive detection of mud crab *Scylla serrata* reovirus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Virol Meth, 2011, 178(1-2): 153-160.
- [13] 祝璟琳, 王国良, 金珊. 养殖大黄鱼病原弧菌多重 PCR 检

- 测技术的建立和应用[J]. 中国水产科学, 2009, 16(2): 156-163.
- [14] Xu X G, Chen G D, Huang Y, et al. Development of multiplex PCR for simultaneous detection of six swine DNA and RNA viruses[J]. J Virol Meth, 2012, 183(1): 69-74.
- [15] Staples M, Graham R M A, Doyle C J, et al. Prolonged and mixed non-O157 *Escherichia coli* infection in an Australian household[J]. Clin Microbiol Infect, 2012(18): E140-E143.
- [16] 张坤, 何启盖. 猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪 A 群轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(8): 1001-1005.
- [17] Sint D, Raso L, Traugott M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success [J]. Meth Ecol Evolut, 2012, 3: 898-905.
- [18] 肖广侠, 李战军, 孟宪红, 等. 白斑综合征病毒(WSSV)3 种 PCR 检测方法的灵敏度比较[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 667-673.
- [19] 饶静静, 李寿崧, 黄克和, 等. 致病性嗜水气单胞菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 749-755.
- [20] 郭倩倩, 陶妍, 谢晶. 南美白对虾中 4 种病原菌的多重 PCR 检测[J]. 食品科学, 2011, 32(10): 148-152.
- [21] Lam W Y, Yeung A C M, Tang J L W, et al. Rapid Multiplex Nested PCR for Detection of Respiratory Viruses[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(11): 3631-3640.
- [22] 肖雯, 聂福平, 王昱, 等. 绵羊痘病毒和山羊痘病毒双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(7): 551-554.
- [23] Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutinimitkul S, et al. Single-Step Multiplex Reverse Transcription -Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Influenza A Virus Subtype H5N1 Detection[J]. Viral Immunol, 2004, 17(4): 588-593.
- [24] 张旻, 林祥梅, 江育林. 蛙虹彩病毒巢式 PCR 检测方法的建立[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 661-666.
- [25] 张琳, 胡北侠, 颜世敢, 等. 鸭黄病毒巢式 PCR 检测方法的建立和应用[J]. 福建农业学报, 2012, 27(2): 124-129.

A duplex nested-PCR assay for detection of mud crab reovirus and mud crab dicistrovirus-1

ZHANG Di^{1,2}, YANG Keng¹, SU Youlu¹, FENG Juan¹, GUO Zhixun¹

1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 210306, China

Abstract: Recent outbreaks of “sleeping disease” have caused mass mortality in cultured mud crab and widespread economic loss in southeast China. Two novel pathogens (Mud Crab Reovirus, MCRV and Mud Crab Dicistrovirus, MCDV-1) have been isolated from crab exhibiting “sleeping symptoms”. Thus, there is an urgent need for the accurate and early detection of this pathogen to facilitate disease control. We developed a duplex nested-PCR protocol for the detection of MCRV and MCDV-1 in *Scylla paramamosain*. Two pairs of primers targeting the conserved regions of the two viruses genes were designed using Primer Premier 5.0. The outer primers for MCRV were ReoF (5'-GCAAATTGAACTACTACTACTTA-3') and ReoR (5'-GATTCCTATTGTCAACTATCTCA-3'), and the inner primers were ReoNF (5'-ACTCATAGAGCAGTCATGGG-3') and ReoNR (5'-ATATCGTCAGAATGTC GTTC-3'). The outer primers for MCDV-1 were DicF (5'-GCACTGGGTACTCTTCTCG-3') and DicR (5'-ACACCTACCAAAGCCCTAC-3'), and the inner primers were DicNF (5'-GGATACTATGGATGATGTTTC-3') and DicNR (5'-ACAAAATACCAGATAAAGCAA-3'). The PCR products were differentiated by size. The first PCR was carried out using a PCR mix consisting of 1 μ L DNA, 1 μ L MCRV outer primer (ReoF/ReoR, 0.5 μ mol/L), 0.4 μ L MCDV-1 outer primer (DicF/DicR, 0.2 μ mol/L), and dH₂O (to a final volume of 20 μ L). The thermal cycle was: 94 $^{\circ}$ C for 3 min, followed by 30 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 30 s, 55 $^{\circ}$ C for 30 s, and 72 $^{\circ}$ C for 1 min, followed by a final

extension at 72°C for 10 min. The nested PCR was carried out using the same mix with 0.2 µL template DNA (the product of the first PCR), 0.8 µL MCRV inner primer (ReoNF/ReoNR, 0.4 µmol/L), and 0.8 µL MCDV-1 inner primer (DicNF/DicNR, 0.4 µmol/L). The conditions were the same as in the first PCR, except the annealing temperature was 53°C. We evaluated the specificity and sensitivity of the duplex nested-PCR. The assay did not exhibit any cross-reactivity with abalone shriveling syndrome-associated virus (AbSV), acute virus necrobiotic virus (AVNV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), fish nervous necrosis virus (NNV), turbot viral reddish body iridovirus (TRBIV), or white spot syndrome virus (WSSV). We used a standard recombinant plasmid for each virus in the sensitivity assay and MCRV/MCDV-1 served as the position control. The detection limit was 10¹ copies of the viral genome for the two viruses. Our results suggest that this technique is a rapid, reliable, and cost effective tool for identification of crab virus with high sensitivity, high specificity. The assay could also be applied as a rapid diagnostic tool in clinical samples in which MCRV or MCDV-1 infection is suspected and differential diagnosis is required.

Key words: *Scylla paramamosain*; MCRV; MCDV-1; duplex-nested PCR

Corresponding author: GUO Zhixun. E-mail: guozhixun1@163.com

书 评

自然保护区工作者陶思明撰写的《自然保护区展望: 以历史使命、生存战略为视觉》一书, 2013年1月由科学出版社出版发行。

全书分为两大部分, 主要讨论了自然保护区的历史使命和生存战略问题, 试图建立自然保护区与经济、社会、文化、教育、科学以及人们日常生产、生活等领域广泛的密切联系, 揭示自然保护区以“自然为本”的本质、发展运行不同于一般经济工作的特点、所处自然-经济-社会复合生态系统背景以及“以人为本”社会中“人”在捍卫自然生态利益上的局限性等。认为自然保护区事业的创建是永衡的, 必须始终坚持生态优先的思想和决策方向, 始终追求有利于落实保护的制度和措施, 努力从指导思想、经济政策、体制机制等方面, 为发展自然保护区事业提供更有力的支持; 要大力增强社会各界和广大公众对自然保护区多种功能的更全面了解, 积极发展公民参与决策, 永存人民心



中的自然保护区, 才能永远立于不败之地; 既坚守生态底线不退缩, 也努力实现更和谐保护, 以实现国家保护目标为导向, 完善自然保护区体系, 化解开发建设与落实保护、经济利益与自然生态利益的具体矛盾冲突, 真正管住有明显危害的开发建设活动, 真正避免人主动施加的不可控威胁, 解放自然力, 确保自然对策最大化, 自然保护区事业才有可能展现乐观的未来, 在曲折前行中实现其伟大历史使命。这事关当代人的幸福和民族的未来, 没有讨价还价的余地。

该书可供各级政府经济发展、自然保护、公共服务、财政支持等部门, 国土规划、产业布局、区域发展、资源环境等研究单位, 以及涉自然保护区政策法规制定、开发建设管理、社区工作、公众传媒、环保志愿者、高等院校相关专业师生和广大自然保护爱好者阅读参考。