

T/ZJSC

团 体 标 准

T/ZJSC 0013—2025

沼虾黄病毒检测方法

Detection methods for Macrobrachium Flavivirus

2025 - 03 - 11 发布

2025 - 04 - 11 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由浙江省水产学会提出并归口。

本文件起草单位：浙江省淡水水产研究所。

本文件主要起草人：潘晓艺、蔺凌云、沈锦玉、张海琪、王甘翔、袁雪梅、姚嘉赟、黄雷、陈静、步夏莲、彭先启、尹文林、黄小红。

沼虾黄病毒检测方法

1 范围

本文件描述了试剂和材料、仪器设备、采样、RNA提取、套式RT-PCR检测、RT-qPCR检测、RT-LAMP检测以及综合判定的方法。

本文件适用于沼虾黄病毒的流行病学调查、检测和监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

沼虾黄病毒 *macrobrachium flavivirus*, MFV

罗氏沼虾铁虾综合症的主要病毒性病原，病毒粒子为具囊膜的直径约55 nm的球形颗粒，核酸类型为单股正链RNA，长度约12.57 kb，又称传染性早熟病毒（Infectious Precocity virus, IPV），为黄病毒科（*Flaviviridae*）成员。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BHQ1: 淬灭剂 (black hole quencher 1)

bp: 碱基对 (base pair)

DEPC: 焦乙酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate)

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

dNTPs: 脱氧核糖核苷三磷酸混合物 (deoxy-ribonucleoside triphosphate mixture)

FAM: 羧基荧光素 (carboxyfluorescein)

IPV: 传染性早熟病毒 (infectious precocity virus)

MFV: 沼虾黄病毒 (*Macrobrachium Flavivirus*)

M-MLV: 莫洛尼鼠白血病病毒 (Moloney murine leukemia virus)

RdRp: RNA依赖的RNA聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase)

RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)

RNasin: 核糖核酸酶抑制剂 (RNase inhibitor)

RT-LAMP: 逆转录环介导等温扩增 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification)

RT-PCR: 逆转录PCR (reverse transcription PCR)

RT-qPCR: 逆转录实时荧光定量PCR (reverse transcription quantitative real-time PCR)

Taq: 水生嗜热杆菌 (*Thermus aquaticus*)

5 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

- 5.1 氯仿。
- 5.2 异丙醇。
- 5.3 无水乙醇。
- 5.4 TRIzol 试剂: 商品化试剂, 4 °C 保存。
- 5.5 dNTPs: 商品化试剂, 含 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 各 10 mmol/L 的混合物, -20 °C 保存。
- 5.6 RNasin (40 U/ μ L): 商品化试剂, -20 °C 保存, 避免反复冻融或温度剧烈变化。
- 5.7 M-MLV 逆转录酶 (200 U/ μ L): 商品化试剂, -20 °C 保存, 避免反复冻融或温度剧烈变化。
- 5.8 5 × M-MLV 逆转录酶缓冲液: 商品化试剂, -20 °C 保存。
- 5.9 10 × PCR 缓冲液: 不含 Mg²⁺, -20 °C 保存。
- 5.10 MgCl₂: 25 mmol/L, -20 °C 保存。
- 5.11 Taq DNA 聚合酶: 商品化试剂, 5 U/ μ L, -20 °C 保存。
- 5.12 琼脂糖电泳核酸染料: 商品化试剂。
- 5.13 DNA 分子量标准: DNA Marker DL2000, -20 °C 保存。
- 5.14 Hot-Start Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L): 商品化试剂, -20 °C 保存。
- 5.15 Bst 3.0 DNA 聚合酶 (8 U/ μ L): 商品化试剂, -20 °C 保存。
- 5.16 AMV 反转录酶 (5 U/ μ L): 商品化试剂, -20 °C 保存。
- 5.17 SYTO 9 绿色荧光核酸染料 (5 mM): 商品化试剂, -20 °C 保存。
- 5.18 琼脂糖: 电泳级。
- 5.19 MFV 套式 PCR 引物: 引物浓度为 10 μ mol/L, -20 °C 保存。第一轮 PCR 引物分别是 MFV533F1 和 MFV533R1, 扩增 MFV 5NTR 基因中的 533 bp 片段 (见附录 B.1); 第二轮 PCR 引物分别是 MFV474F2 和 MFV474R2, 从上述片段中再扩增 474 bp 的片段。引物序列如下:
 - a) MFV-533F1: 5' -GAAGTCAGAGCGACAGCGAG-3' ;
 - b) MFV-533R1: 5' -TGGGCGATCCCTCCTGTTT-3' ;
 - c) MFV-474F2: 5' -TTGGGTTGTTTGAGGTGTGAA-3' ;
 - d) MFV-474R2: 5' -CCTCCTGTTTCGATGACTAGCA-3' 。
- 5.20 MFV 荧光定量 PCR 引物: 引物和探针浓度为 10 μ mol/L, -20 °C 保存。扩增引物分别是 MFV-Tq140F 和 MFV-Tq140R, 扩增 MFV E 基因中的 140 bp 片段 (见附录 B.2); 探针 MFV-TqMAN。引物、探针序列如下:
 - a) MFV-Tq140F: 5' -AGGAGAGGGTTTTGGCTTG-3' ;
 - b) MFV-Tq140R: 5' -CTGGATTGGAAGGGAAGTCTG-3' ;
 - c) MFV-TqMAN: 5' -6-FAM-CCGCGACACTTACAAGTCCCTT-BHQ1-3' 。
- 5.21 MFV RT-LAMP 引物: 配制引物预混液, 各引物终浓度分别为 MFV-FIP、MFV-BIP: 16 μ mol/L, MFV-F3、MFV-B3: 2 μ mol/L, MFV-LpF: 8 μ mol/L, -20 °C 保存。引物组扩增 MFV NS 基因的 236 bp 片段 (见附录 B.3); 引物序列如下:
 - MFV-FIP: 5' -CCTCCTGTGCTTCACTATGACTTTAGACAGCCTCTATCTACTTC-3' ;
 - MFV-BIP: 5' -GATATCACGGACGGCGAGTTTATAGCATCAGACAGCGAT-3' ;
 - MFV-F3: 5' -GAACCACTGACTAGACCA-3' ;
 - MFV-B3: 5' -TCTGTCATCACATCCACA-3' ;
 - MFV-LpF: 5' -TGTGACAATCGCCATAACA-3' 。
- 5.22 阳性对照: 受 MFV 感染且 RT-PCR 结果显示强阳性的虾组织, -80 °C 保存。
- 5.23 阴性对照: 未受 MFV 感染且 RT-PCR 结果显示阴性的虾组织, -80 °C 保存。
- 5.24 空白对照: 无 RNA 酶的水。

6 仪器设备

- 6.1 普通冰箱。
- 6.2 超低温冰箱: -80 °C。

- 6.3 组织研磨器。
- 6.4 生物安全柜或超净工作台。
- 6.5 低温高速离心机：4℃，转速 ≥ 12000 r/min。
- 6.6 漩涡振荡器。
- 6.7 可控温水浴锅或加热模块。
- 6.8 微量移液器。
- 6.9 PCR 仪。
- 6.10 电泳仪。
- 6.11 水平电泳槽。
- 6.12 紫外透射仪或凝胶成像仪。
- 6.13 微波炉或电炉。
- 6.14 荧光定量 PCR 仪。

7 采样

7.1 对象

优先采集罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 和日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 淡化后的仔虾、稚虾和出现临床症状的成虾，临床症状见附录 A。

7.2 数量

按SC/T 7103的规定执行。

7.3 器官或组织

幼体与仔虾取整体；稚虾和成虾宜取鳃、心脏、附肢、眼柄或血淋巴，避免取眼球和肝胰腺等组织。非致死性方式取样的亲虾，可采集游泳足或鳃片。组织样品 0℃~4℃低温状态运送至实验室。

8 RNA 提取

取样品 30 mg ~ 50 mg 置于 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中，加入 1 mL TRIzol 试剂，充分研磨后，室温 5 min，加入 0.2 mL 氯仿，震荡混匀 15 s，室温 5 min。于 4℃下，12000 r/min 离心 10 min，取上层水相，移至新离心管中。加入 0.5 mL 预冷的异丙醇，振荡器上混匀，室温 10 min。于 4℃下，12000 r/min 离心 10 min，弃上清。加入 1 mL 预冷的无 RNA 酶 70%乙醇，振荡 1 min，再于 4℃下，12000 r/min 离心 5 min，弃上清，室温晾干沉淀。加入 30 μ L ~ 50 μ L DEPC 处理的水溶解，测定 RNA 质量和浓度后，立即用于 RT-PCR 或保存于-80℃备用。同时设置阳性对照样品和阴性对照样品。也可采用等效的商品化 RNA 提取试剂或 RNA 提取试剂盒。

9 套式 RT-PCR 检测

9.1 cDNA 合成

在冰盒上配制 10 μ L cDNA 合成反应体系。对每一份样品，在一支无 RNA 酶的 0.2 mL PCR 管中，加入 1.5 μ L 10 μ M 引物 MFV533R1，2.5 μ L 无 RNA 酶水和 2 μ L 待测样品 RNA 模板 (1 ng/ μ L ~ 1000 ng/ μ L)。混匀后，稍离心，置于 70℃，10 min，然后立即置于冰中。加入 2 μ L 5 \times M-MLV 逆转录酶缓冲液、1 μ L RNasin、0.5 μ L 10 mmol/L dNTPs、0.5 μ L M-MLV 逆转录酶，42℃保温 1 h，以合成 cDNA，然后于 80℃中 5 min 后，迅速置于冰中。合成的 cDNA 可立即用于 PCR 扩增，或保存于-20℃备用。也可采用等效的商品化 cDNA 合成试剂盒，或在 9.2 中采用等效的商品化一步法 RT-PCR 试剂盒。

9.2 第一轮 PCR 扩增

在冰盒上配制 50 μ L 第一轮 PCR 反应体系。在反应管中加入：水 33 μ L、10 \times PCR 缓冲液 5 μ L、dNTPs 1 μ L、MgCl₂ 3 μ L、引物 MFV533F1 1 μ L、引物 MFV533R1 1 μ L、合成的 cDNA 5 μ L、Taq DNA 聚合酶 1 μ L。混

匀，置于PCR仪中。按以下程序进行第一轮PCR扩增：95℃ 5 min；95℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 45 s，35个循环；72℃ 10 min，4℃ 保存。也可采用等效的商品化PCR试剂盒或一步法RT-PCR试剂盒。

9.3 第二轮 PCR 扩增

在冰盒上配制50 μL第二轮PCR反应体系。在反应管中加入：水37 μL、10×PCR缓冲液5 μL、dNTPs 1 μL、MgCl₂ 3 μL、引物MFV474F2 1 μL、引物MFV474R2 1 μL、第一轮PCR产物1 μL、Taq DNA聚合酶1 μL。混匀，置于PCR仪中。按以下程序进行第二轮PCR扩增：95℃ 5 min；95℃ 30 s，62℃ 30 s，72℃ 45 s，35个循环；72℃ 10 min，4℃ 保存。也可采用等效的商品化PCR试剂盒。

9.4 琼脂糖电泳

使用1×电泳缓冲液配制2%的琼脂糖凝胶，待凝胶冷却至低于60℃时，按比例加入核酸染料，摇匀，制备琼脂糖凝胶。将5 μL PCR扩增产物和1 μL 6×载样缓冲液混匀后加入到加样孔中，同时设立DNA分子量标准对照。电泳时，当载样缓冲液中的溴酚蓝指示剂色带迁移至琼脂糖凝胶2/3处时停止电泳，在紫外透射仪或凝胶成像仪下观察并拍照记录。如果观察到预期大小扩增片段，对PCR扩增产物进行测序，并对测序结果进行序列比对。

9.5 结果判定

9.5.1 阳性对照第一轮 PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳 533 bp 和/或第二轮 PCR 产物在 474 bp 处有特定条带，阴性对照在 533 bp 和 474 bp 处均无条带，且空白对照不出现任何条带，实验有效。

9.5.2 当被检样品第一轮 PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳 533 bp 处有条带和/或第二轮 PCR 产物在 474 bp 处有特异条带，且 PCR 产物测序结果同参考序列（参见附录 B.1）相符的，判为阳性。

9.5.3 当被检样品第一轮 PCR 产物未见大小为 533 bp 条带且第二轮 PCR 产物未见大小为 474 bp 的条带，或 PCR 产物经测序确定不是 MFV 的，判为阴性。

10 RT-qPCR 检测

10.1 cDNA 合成

按9.1操作。

10.2 qPCR 扩增

在冰盒上配制25 μL qPCR反应体系。在qPCR反应管中加入：双蒸水11.75 μL、10×PCR缓冲液2.5 μL、dNTPs 1 μL、MgCl₂ 2 μL、引物MFV-Tq140F 1 μL、引物MFV-Tq140R 1 μL、探针MFV-TqMAN 0.75 μL、合成的cDNA 4 μL、Hot-Start Taq DNA聚合酶 1 μL。混匀，置于荧光定量PCR仪中。按以下程序进行qPCR扩增：95℃ 10 min；95℃ 10 s，60℃ 30 s，40个循环。每次循环收集一次FAM荧光信号。循环结束后，确定Ct值。也可采用等效的商品化qPCR试剂盒或一步法RT-qPCR试剂盒。

10.3 结果判定

10.3.1 若阴性对照 Ct 值 > 37 且无典型“S”形扩增曲线，阳性对照 Ct 值 ≤ 37，并出现典型“S”形扩增曲线，则判定试验有效。

10.3.2 若样品的 Ct 值 ≤ 37，且出现典型“S”形扩增曲线，则判定 RT-qPCR 检测结果为阳性。

10.3.3 若 37 < 样品的 Ct 值 ≤ 40 时，应对样品再次检测。再次检测时加入 5 μL 模板，并相应减少 DEPC 水的体积，若再次检测样品的 Ct 值 ≤ 37，且出现典型的“S”形扩增曲线，判定 RT-qPCR 检测结果为阳性，否则判定为阴性。

10.3.4 若样品无典型“S”形扩增曲线，结果判定 RT-qPCR 检测结果为阴性。

11 RT-LAMP 检测

11.1 RT-LAMP 扩增

按照表1要求，在洁净区在冰盒上配制 $2 \times$ RT-LAMP反应预混液，充分混匀，分装保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。临用前，根据反应数，在冰盒上每个PCR管中配制 $25\text{ }\mu\text{L}$ RT-LAMP反应体系：双蒸水 $8\text{ }\mu\text{L}$ ， $2 \times$ RT-LAMP反应预混液 $12.5\text{ }\mu\text{L}$ ，MFV-LAMP引物预混液 $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 。然后按空白对照、阴性对照、待检样品、阳性对照的次序分别加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ RNA为模板，置于荧光定量PCR仪中。按以下程序进行RT-LAMP扩增： $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s，50个循环。每次循环收集一次FAM荧光信号。循环结束后，确定Ct值。也可采用等效的商品化RT-LAMP试剂盒。

表 1 100 份 $2 \times$ RT-LAMP 反应预混液所需试剂组成

成分	添加量	试剂终浓度
Tris-HCl (pH 8.8、1 M)	$50\text{ }\mu\text{L}$	40 mM
MgSO_4 (100 mM)	$175\text{ }\mu\text{L}$	14 mM
KCl (2.5 M)	$50\text{ }\mu\text{L}$	100 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 M)	$25\text{ }\mu\text{L}$	20 mM
Tween 20 (10%)	$25\text{ }\mu\text{L}$	0.2%
dNTPs (10 mM)	$350\text{ }\mu\text{L}$	2.8 mM
甜菜碱 (6 M)	$333.3\text{ }\mu\text{L}$	1.6 M
SYTO 9 核酸染料 ($50\text{ }\mu\text{M}$)	$25\text{ }\mu\text{L}$	$1\text{ }\mu\text{M}$
Bst 2.0 DNA 聚合酶 ($8\text{ U}/\mu\text{L}$)	$100\text{ }\mu\text{L}$	$0.64\text{ U}/\mu\text{L}$
AMV 反转录酶 ($10\text{ U}/\mu\text{L}$)	$50\text{ }\mu\text{L}$	$0.4\text{ U}/\mu\text{L}$
双蒸水	$66.7\text{ }\mu\text{L}$	—
100 份反应预混物总体积	$1250\text{ }\mu\text{L}$	$2 \times$

11.2 结果判定

11.2.1 若阴性对照和空白对照无 Ct 值或 Ct 值 > 45 且无典型“S”形扩增曲线，阳性对照 Ct 值 ≤ 30 ，并出现典型“S”形扩增曲线，则判定试验有效。

11.2.2 若样品的 Ct 值 ≤ 30 ，且出现典型“S”形扩增曲线，则判定 RT-LAMP 检测结果为阳性。

11.2.3 若 $30 <$ 样品的 Ct 值 ≤ 45 时，应对样品再次检测。再次检测时加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 模板，并相应减少 DEPC 水的体积，若再次检测样品的 Ct 值 ≤ 30 ，且出现典型的“S”形扩增曲线，判定 RT-LAMP 检测结果为阳性，否则判定为阴性。

11.2.4 若样品 Ct 值 > 45 时或无典型“S”形扩增曲线，结果判定 RT-LAMP 检测结果为阴性。

12 综合判定

同时满足以下两条，即可判定为MFV检测阳性：

- 套式RT-PCR检测结果为阳性，且测序结果正确；
- RT-qPCR检测结果为阳性；
- RT-qLAMP检测结果为阳性。

附 录 A
(资料性)
沼虾黄病毒感染 (infection with MFV)

A.1 疾病描述

沼虾黄病毒感染可引起罗氏沼虾生长缓慢、性早熟为主要特征的铁虾综合症（俗称“铁虾病”）。

A.2 病原特征

沼虾黄病毒 (*Macrobrachium Flavivirus*, MFV) 属于黄病毒科介于荆门病毒和黄病毒属之间的一个新属, 为球形、直径约55 nm、具囊膜的病毒。其基因组为正义单链RNA, 全长约12.57 Kb, 存在一个“程序性核糖体移位 (programmed ribosomal frameshifting, PRF)”位点。其具有嗜神经性, 可水平传播和垂直传播。

A.3 易感宿主

易感宿主为罗氏沼虾和日本沼虾, MFV可感染沼虾生长全阶段, 造成罗氏沼虾生长至5 cm ~ 6 cm时, 出现性早熟和生长缓慢症状。该病毒非沼虾致死性病原。

A.4 临床症状

主要表现为生长缓慢、性腺发育提前、脱壳延缓、壳色深且硬, 并具有传染性的特征。养殖60 d ~ 80 d, 体长仅为5 cm ~ 7 cm, 出现副性征, 雌虾开始抱卵, 雄虾第二步足变长, 典型病例可超过体长1.5倍以上, 第二步足前端出现淡蓝色甚至蓝色的指节, 指关节外侧有绒毛。

附录 B

(资料性)

沼虾黄病毒引物及探针在靶基因中的位置

B.1 MFV 套式RT-PCR引物在靶基因中的位置 (GenBank登录号: MT648663)

301 AATGGGGAGGGGACTAACCGAAGTCAGAGCGACAGCGAGAGCCTTGTTTGGGGCGCGACT
 361 TGTAAGCTTTTGGGTTTGTTTGAGGTGTGAAAGTTTTGGGACGATCCCAGACCCGGTATT
 421 TTAGCTATCCGTGGTGTGGAACCTAAGTAAGAGACAGCCGAAACAAAATGTGGGTGAAGC
 481 TGTAAGCCCAGCTTAGGCAACCAGGTGACTCTCATTACCGGAACACTTCTAGAACTCAGG
 541 GGCTGAAGGGGCGGCCTCACACTTGGCTCTTGTTTATGGTGGCAGACTAAAGCCCCATT
 601 TAATGCTTCTCATGATGAACTAGCGGGGTGTTACTACTATCCAAGCCTTAAACACCACAC
 661 AAGTCAGTGTGCTCATGAGAACCTGATTTGGAGTGTCCATTTGGCACTTTTCGCCTTGA
 721 AGTTCCTCCGTCAGTGGCCCTCTTGTGCTTGGGGACTTCCACATATGATAGGTTAGTTA
 781 CTAAACCAGAGCGTAGCAGTATCCCCTGCCTAGGGACTGGTGCTAGTCATCGAAACAGG
 841 AGGGATCGCCCAGCTCGCAACTGGGGTACGCCCTAGGGACGTTGAAGCTTGGACAAACTT
 MFV-533F1
 MFV-474F2
 MFV-474R2
 MFV-533R1

B.2 MFV RT-qPCR引物和探针在靶基因中的位置 (GenBank登录号: MT648663)

MFV-Tq140F
 5-AGGAGAGGGTTTTGGCTTGGACGAGCTAGTCAACATCAAAGTTGGAAATGGATGGATTCTTTGTAAGCGA
 3-TCCTCTCCAAAACCGAACCTGCTCGATCAGTTGTAGTTTTCAACCTTACCTACCTAAGAAACATTTCGCT
 MFV-TqMAN
 5-GGACCACTTAAGACATGTTGGGCTCCGCGACACTTACAACTGCCCTTCCCAGAGTTCCTTCCAATCCAG
 3-CCTGGTGAATTCGTACAACCCGAGGCGCTGTGAATGTTGACGGGAAGGGTCTCAAGGGAAGGTTAGGTC
 MFV-Tq140R

B.3 MFV RT-qLAMP引物在靶基因中的位置 (GenBank登录号: MT648663)

5521 TTCCCAACCCCTCCAAAGTGGGGGGGGAACCAGTACTAGACCAAGTGATAGACAGCCT
 5581 CTATCTACTTCTGATCATTGTTATGGCGATTGTCACATTGTCAATAGTCATAGTGAAGCA
 5641 CAGGAGGAAGTCCAAATTGATATCACGGACGGCGAGCTCTTTATGAACTCAGCTGTGGAA
 5701 CAGGAGATGACATCGCTGTCTGATGCTATAATAGTTCTTGCAACCTTTGTCTACGTTTGC
 5761 ATACTTGTGGATGTGATGACAGAGAATATAACAACTATTATGAGGTTAGATTGAGATTG
 MFV-F2
 MFV-LpF
 MFV-F3
 MFV-F1c
 MFV-B1c
 MFV-B2
 MFV-B3