

文章编号: 1674-5566(2025)06-1263-07

DOI: 10.12024/jsou.20241104707

养殖水体的核酸富集技术在鳜蛙虹彩病毒检测中的应用及其性能评价

许童辉^{1,2,3}, 任馨雨^{1,2,3}, 任弋林^{1,2,3}, 张俊哲⁴, 翁少萍⁴, 许丹^{1,2,3}, 王姝然⁵

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 国家水生动物病原库, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源与利用重点实验室, 上海 201306; 4. 中山大学 水产动物疫病防控与健康养殖全国重点实验室, 广东 广州 510275; 5. 辽宁省淡水水产科学研究院 辽宁省水生动物病害防治重点实验室, 辽宁 辽阳 111000)

摘要: 旨在建立一种基于磁珠富集法的养殖水体中鳜蛙虹彩病毒的检测方法。结果显示, 该方法能有效富集养殖水样中的鳜蛙虹彩病毒, 通过常规PCR法扩增可获得特异性条带。定量分析显示, 磁珠富集法结合实时荧光定量PCR技术, 其灵敏度达到0.01 copies/μL的检测限。可行性分析证明, 磁珠富集法与qPCR检测结果具有90%的一致性, 且适用于全自动核酸检测平台。与传统qPCR方法相比, 该方法在保持高检测一致性的同时, 具备更好的抗干扰能力和操作便捷性。本研究开发的检测技术具有操作简便、灵敏度高等特点, 为养殖水体病原监测和早期预警提供了可靠的技术支持, 对水产养殖病害防控具有重要实践意义。

关键词: 鳜蛙虹彩病毒; 养殖水体; 病毒检测; 磁珠法

中图分类号: S 941.41 文献标志码: A

鳜蛙虹彩病毒(Mandarin fish ranavirus, MRV)是近年来严重危害我国淡水养殖业的一种高致病性病原体, 主要感染鳜鱼(*Siniperca chuatsi*)和大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)等经济价值较高的肉食性鱼类。该病毒属于虹彩病毒科(Iridoviridae), 其基因组大小为99 028 bp, 编码125个开放阅读框(ORF), 与大口黑鲈虹彩病毒(Largemouth bassvirus, LMBV)基因组相似性大于98%^[1]。研究发现鳜蛙虹彩病毒主要侵袭鱼体的肝脏、脾脏、肾脏和肠道, 感染鱼体一般表现为体色变黑、嗜睡等症状^[2]。水生动物因其生存的水体环境复杂多样, 更易受环境影响。鳜蛙虹彩病毒可通过水体快速水平传播, 因此发展高效的水体病毒检测技术对防控该病至关重要^[3]。

目前, 病毒检测方法包括细胞培养法^[4]、环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[5]、荧光定量PCR(Quantitative PCR, qPCR)^[6]、电子显微镜技术^[7]等, 其中qPCR技术因高灵敏度和特异性被广泛应

用。病毒富集是水体病原检测的关键步骤, 常用方法包括膜过滤法、聚乙二醇沉淀法和超离心法^[8]。过滤法操作简便但易堵塞; 粘凝沉淀法成本低但试剂消耗大; 超离心法快速但易损失病毒。相比之下, 磁珠富集法优势显著, 其通过表面修饰可实现病毒特异性吸附, 且适用于高通量自动化检测, 显著提高检测效率^[9]。然而, 目前磁珠富集法在养殖水体病毒检测中的应用尚未见报道。尽管鳜鱼组织中的病毒监测技术已较为成熟, 但针对养殖水环境的病毒富集与检测仍缺乏高效方法。

本研究拟建立基于磁珠富集法的鳜虹彩病毒快速检测技术, 以解决养殖水体病毒监测难题, 有望为池塘和工厂化养殖的病害预警提供高效且灵敏的检测手段。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所使用的患病鱼体、养殖水样来自上

收稿日期: 2024-11-23 修回日期: 2025-04-13

基金项目: 水产动物疫病防控与健康养殖全国重点实验室2024年开放课题(2024SKLBC-KF02); 上海市自然科学基金面上基金(22ZR1427200)

作者简介: 许童辉(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生动物病害。E-mail: 1002461612@qq.com

通信作者: 王姝然, E-mail: 2053569101@qq.com

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydxxb.com>

海城市电力发展有限公司鳜循环水养殖池和广东省佛山市顺德区杏坛镇的鳜养殖厂及其厂区不同水域。本研究获得了上海海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准,实验过程中操作人员严格遵守上海海洋大学伦理规范,并按照上海海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 实验方法

1.2.1 设计引物

用于构建重组质粒的引物应具有高特异性、

表1 PCR引物信息
Tab. 1 PCR primer information

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度 Product length/bp	功能 Function
MCP	MRV-PCR-F	AGTACACCATGCCAGAGGCCAAGC	400	PCR ^[10]
	MRV-PCR-R	CCATGTCCCTGACTGAGCTGCTC		
	MRV-mcp-F	ATGGGCAGCGATATGCTTCTGTTACGGGTTCTG	1 329	构建标准质粒
	MRV-mcp-R	GGATCCGTCGACGATTACAGGATGGGGAAACCCATG		
	MRV-qPCR-F	TCGCCACTTATGACAGCCTGA	202	qPCR
	MRV-qPCR-R	ACCAGCCAAGAGTTGAGCACAT		

1.2.2 磁珠富集法与常规PCR方法检测

将不同养殖池以及养殖厂内不同区域采得的水样进行分组编号,使用KingFisher全自动核酸提取仪(型号:KingFisher Flex, ThermoFisher scientific)以及MagMAX™ Ultra 废水核酸分离和病毒富集试剂盒(货号:A52610, ThermoFisher scientific)按照其说明书所示步骤对养殖水样的核酸进行富集,将所得样品作为DNA模板使用PCR方法进行检测,反应体系:PrimeSTAR MAX DNA Polymerase 12.5 μL、MRV-PCR-F 1 μL、MRV-PCR-R 1 μL、DNA模板 2 μL、ddH₂O 8.5 μL;反应程序:98 °C预变性3 min、98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 5 s, 34次循环, 72 °C延伸10 min, 4 °C保存备用。

将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,使用1.5%的琼脂糖凝胶,在120 V电压下进行35 min电泳,使用凝胶成像仪进行拍照,得到结果。

1.2.3 MRV-mcp标准质粒的构建

选择pMAL-c5X质粒作为空载体、长度为1 329 bp的MRV-mcp基因作为目的基因,进行重组质粒的构建,pMAL-c5X质粒由上海海洋大学国家水生动物病原库提供。为确保不破坏目的基因的功能区域和质粒的复制起点,使用Snap Gene 6.0.2软件选择其酶切位点为EcoRV。

55 ~ 65 °C的退火温度、40% ~ 60%的CG含量等特点。使用Snap Gene 6.0.2软件设计MRV-mcp-F/R(表1),用于重组质粒的构建,通过Primer Premier 5.0软件设计MRV-qPCR-F/R和MRV-PCR-F/R(表1),用于qPCR和PCR,所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计。

使用病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒[目录号:DP315,天根生化科技(北京)有限公司]提取病鱼肾脏、肝脏和脾脏DNA,使用引物MRV-mcp-F/R(表1)对其进行PCR扩增,将得到的产物进行琼脂糖凝胶电泳后回收产物,将回收产物与pMAL-c5X连接,连接位点EcoRV,对得到的重组质粒扩增、测序、-20 °C冷冻保存以便于后续实验,测序公司是生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2.4 MRV-mcp标准曲线的建立

将标准质粒进行10倍梯度稀释后,作为参考模板,通过qPCR进行扩增,使用引物qPCR-F/R(表1),反应体系13 μL:ddH₂O 4.5 μL、TB Green Premix EX Taq 6.5 μL、正反向引物各0.5 μL,标准质粒1 μL;反应条件:预变性95.0 °C, 30 s、变性95.0 °C, 5 s、退火58.0 °C, 30 s、循环39次,将得到的数据进行处理以获得5点标准曲线。

1.2.5 磁珠富集法测定MRV核酸极限值

分别将浓度为10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10 copies/μL的标准质粒各1 μL溶解至10 mL纯水中混匀作为水样,使用KingFisher全自动核酸提取仪(型号:King Fisher Flex, Thermo Fisher Scientific)以及MagMAX™ Ultra 废水核酸分离和病毒富集试剂盒(货号:A52610, Thermo Fisher

Scientific)按照其说明书所示步骤对养殖水样中的核酸进行富集,所得产物约为100 μL,将富集前后的核酸分别进行qPCR,测定其富集的极限值。

1.2.6 养殖水体检测

将不同养殖池采集到的养殖水分别编号1~10,各取15 mL水样作为检测的样品。使用磁珠富集法对其中的核酸进行富集,得到约100 μL富集产物。使用全自动核酸检测分析仪(广州好芝生物科技有限公司,S6110)与鳜鱼病原四项微流控核酸检测试剂盒(广州好芝生物科技有限公司)对富集产物进行检测并对其进行qPCR检测,将所得结果进行比较。

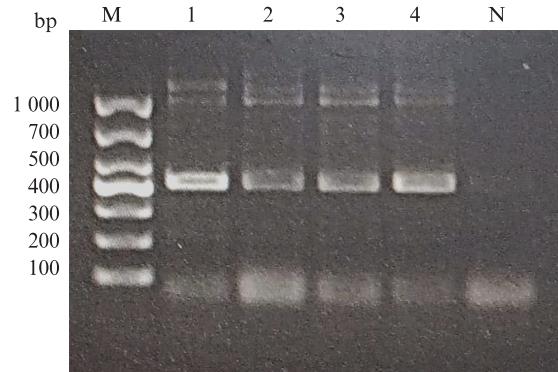
2 结果

2.1 磁珠富集法与常规PCR检测结果

通过对1~4号养殖池采得的水样进行磁珠富集以及PCR检测,产物大小为400 bp,得到的检测结果如图1所示,同样采用磁珠富集法对5~9号养殖池以及养殖厂内各区域采得的水样进行PCR检测,结果如图2所示。以上结果证明在目标养殖池及其不同区域的水样中均检出鳜鱼虹彩病毒,这证实了磁珠富集法在养殖水体病毒检测中的可行性和有效性。

2.2 MRV-mcp标准曲线

根据qPCR结果进行5点标准曲线的绘制,



M. 标准物质 1 000; 1. 1号养殖池; 2. 2号养殖池; 3. 3号养殖池; 4. 4号养殖池; N. 阴性对照。

M. Marker 1 000; 1. Pond 1; 2. Pond 2; 3. Pond 3; 4. Pond 4; N. Negative control.

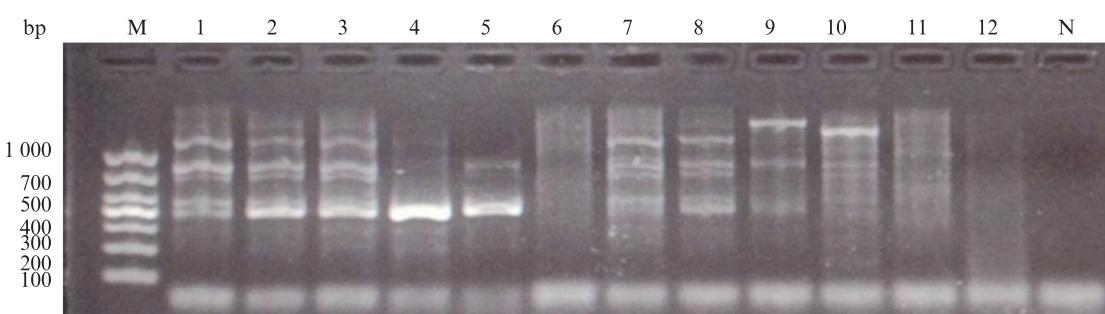
图1 1~4号养殖池水样PCR检测结果

Fig. 1 Results of PCR testing of water samples from ponds No. 1-4

标准曲线如图3所示,回归方程为 $y=-3.176\ 9x+38.196$, $R^2=0.992\ 3$,横坐标为标准质粒拷贝数浓度的对数,纵坐标为Cq值,该曲线可用于后续实验结果数据处理。

2.3 磁珠富集法测得鳜鱼虹彩病毒核酸的极限值

梯度稀释后的质粒浓度为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10 copies/μL,各取1 μL加入至10 mL纯水中,采用磁珠富集法富集核酸后,对系列稀释的重组质粒及其扩增产物进行qPCR检测。经定量分析表明,该方法的检测灵敏度可达0.01 copies/μL(图4)。



M. 标准物质 1 000; 1. 5号养殖池; 2. 7号养殖池; 3. 8号养殖池; 4. 9号养殖池; 5. 初滤池; 6. 外车间; 7. 滤池; 8. 7号固液分离池; 9. 2号池; 10. 3号平列池; 11. 左侧外池; 12. 右侧外池; N. 阴性对照。

M. Marker 1 000; 1. Pond 5; 2. Pond 7; 3. Pond 8; 4. Pond 9; 5. Primary filtration pond; 6. Outer workshop; 7. Filtration pond; 8. Solids-liquid separation pond 7; 9. Pond 2; 10. Flat-line pond 3; 11. Left outer pond; 12. Right outer pond; N. Negative control.

图2 5~9号养殖池以及养殖厂内各区域水样PCR检测结果

Fig. 2 Results of PCR testing of water samples from ponds 5-9 and various areas of the plan

2.4 基于磁珠富集法进行养殖水体病毒检测的可行性分析

通过全自动核酸检测分析仪富集核酸后进行定量分析发现,第1~9组的鳜蛙虹彩病毒Ct值分别为34.7、36.7、35.8、35.0、38.2、35.9、37.1、39.3、37.8,1~5组传染性脾肾坏死病毒Ct值分别为35.2、35.6、36.9、37.1、43.9,其余各组未检测到脾肾坏死病毒(图5)。通过qPCR法检测水体中富集的鳜蛙虹彩病毒发现,第1~9组Ct值分别为29.62、33.37、33.67、33.35、35.56、34.19、32.67、37.03、36.88(图6)。经过差异性分析发现全自动核酸检测仪检测结果Ct值略高于qPCR法,第1组样本有显著差异,2~10组没有差异。以上结果说明两种方法的符合率为90%,进一步证明本研

究所采用的磁珠富集法具有一定的可行性(图7)。

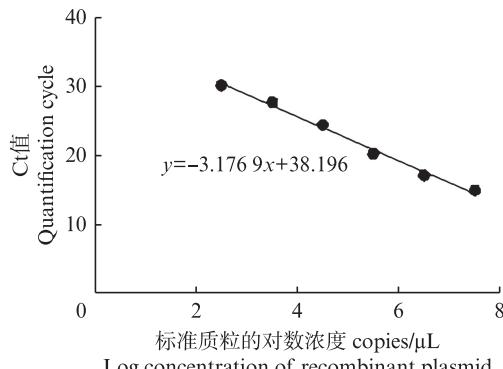
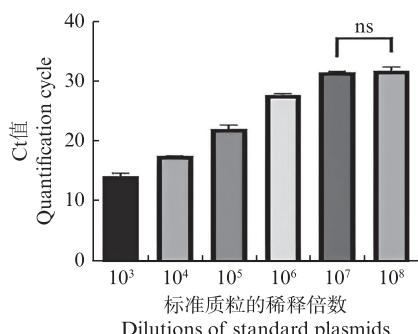
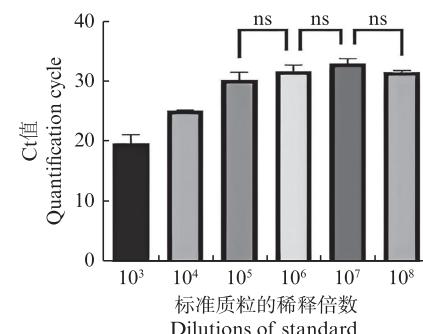


Fig. 3 MRV-mcp recombinant plasmid standard curve
图3 MRV-mcp重组质粒标准曲线



(a) 富集前使用标准质粒10倍稀释后进行qPCR的结果
ns. 无显著差异。 ns. not significant.



(b) 富集后使用标准质粒10倍稀释后进行qPCR的结果

图4 富集前后的qPCR结果
Fig. 4 qPCR results before and after enrichment

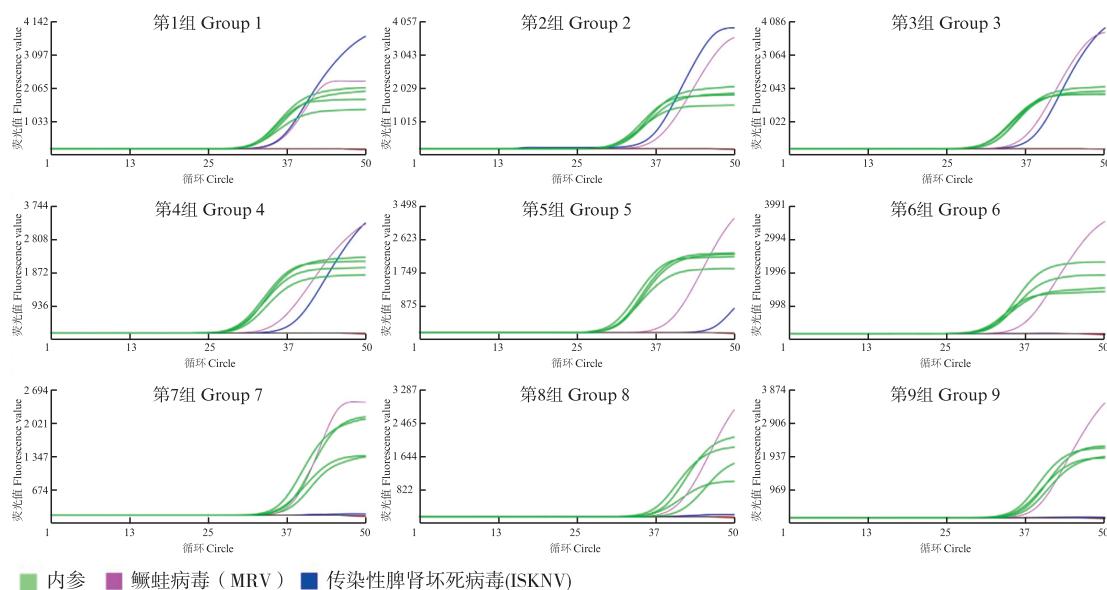


图5 全自动核酸检测分析仪检测养殖水体富集核酸结果

Fig. 5 Fully automated nucleic acid detection analyzer results for nucleic acid enrichment in culture water

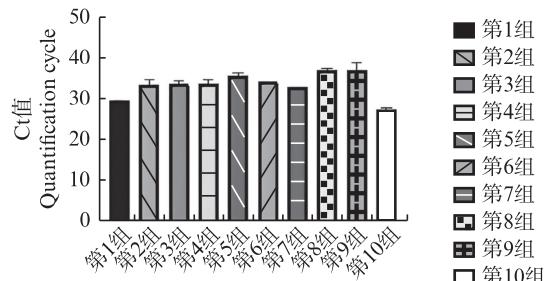
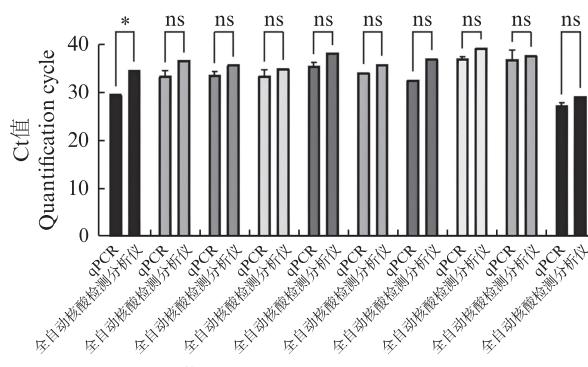


图6 qPCR方法检测养殖水体富集核酸结果
Fig. 6 qPCR method for detecting nucleic acid enrichment in aquaculture water



*P<0.05; ns. 无显著差异。ns. not significant.

图7 两种检测方法的差异性分析
Fig. 7 Analysis of the variability of the two detection methods

3 讨论

在水产养殖中,养殖水环境的安全监测至关重要。作为水生动物病毒传播的主要媒介,水体中的病原体可通过水平传播导致疫情暴发,造成严重的经济损失。因此,建立高效的水体病毒核酸富集与提取方法是病原检测的关键前提,其中核酸富集质量直接决定检测结果的可靠性。当前水环境病毒富集技术多样,包括超速离心法、固相吸附-洗脱法、絮凝沉淀法等。其中,传统絮凝沉淀法通过沉淀病毒多聚体实现与水溶液分离,病毒回收率较超离心法提高一倍,但该方法仅适用于小容量水体^[11]。针对大容量水样,有研究采用带负电荷的混合纤维酯膜进行两步过滤浓缩,肠道病毒回收率为8.8%~16.0%^[12]。然而,上述方法均依赖特殊仪器且操作复杂,不适用于养殖水体。

本研究采用正电荷修饰磁珠吸附带负电的病毒颗粒,通过阴离子交换洗脱实现快速富集。该方法具有特异性强、分离快速、纯化度高和操作简便等优势,是一种具有重要推广价值的技

术。已有研究表明,磁珠富集技术在病毒检测领域展现出显著的性能优势。阳海怡等^[13]通过系统比较磁珠富集法与聚乙二醇沉淀法对新型冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)的富集效率,发现磁珠富集法的检测灵敏度可达0.1 copies/μL,同时其回收率的变异系数显著低于聚乙二醇沉淀法,这一结果充分证实了磁珠富集法在检测灵敏度和结果稳定性方面的优越性^[14]。在诺如病毒(Norovirus, NoV)核酸提取方面,尽管磁珠富集法在提取效率上并非最高,但其自动化操作特性可大幅提高样本处理通量,显著提升大规模检测的工作效率^[15]。特别值得注意的是,在模拟诺如病毒污染草莓的实验中,磁珠富集法对病毒的浓缩效果明显优于传统的聚乙二醇沉淀法^[16],这进一步证明了该方法在痕量病毒检测中的应用潜力。本研究采用qPCR技术对经磁珠富集法处理的养殖水样进行鳜蛙虹彩病毒检测,结果显示第1~9组的Ct值为29.62~37.03,其中第1组样本Ct值最低,提示该位点可能存在较高的病毒污染风险。与全自动核酸分析仪相比,qPCR法检测结果普遍呈现更低的Ct值,且第1组样本的差异具有统计学显著性(P<0.05)。这种差异可能归因于qPCR法具有更高的检测灵敏度、核酸提取效率的差异以及检测过程中的系统误差,特别是第1组样本的高病毒载量可能放大了方法间的差异,这提示在高浓度样本检测时需要特别关注方法的选择和标准化流程。尽管本研究样本量有限(n=9),但90%的总体符合率仍具有统计学意义,证实了磁珠富集法在养殖水体病毒监测中的实用价值。然而,考虑到样本数量对统计效力的影响、不同养殖环境水体成分的差异性以及季节因素对病毒载量的潜在影响,建议后续研究应扩大样本规模,涵盖更多养殖场景和季节变化,以进一步验证该方法的稳定性和适用性。本研究结果为开发高效可靠的养殖水体病毒监测技术提供了重要依据,但检测流程的优化和标准化操作规范的建立仍需进一步深入研究。

鉴于养殖水体中病毒含量通常较低,且现有检测方法的灵敏度尚不足以直接检测未经浓缩的水体病毒,因此,水体核酸浓缩成为病毒检测的关键步骤。本研究旨在利用现有技术和研究基础,建立了以磁珠富集法为基础并结合PCR、

qPCR 和微流控芯片等技术的病毒检测技术体系,为今后水体中鳜蛙虹彩病毒的检测工作奠定了基础。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] DONG C F, WANG Z M, WENG S P, et al. Occurrence of a lethal ranavirus in hybrid mandarin (*Siniperca scherzeri* × *Siniperca chuatsi*) in Guangdong, South China [J]. Veterinary Microbiology, 2017, 203: 28-33.
- [2] 孙妍, 董学旺, 陈浩楠, 等. 天津地区1例患病鳜的病原学初步鉴定与分析[J]. 农业科学, 2024, 14(12): 1293-1300.
- [3] SUN Y, DONG X W, CHEN H N, et al. Preliminary identification and analysis of the pathogen of *Siniperca chuatsi* disease in Tianjin [J]. Hans Journal of Agricultural Sciences, 2024, 14(12): 1293-1300.
- [4] CÁMARA-RUIZ M, CEREZO I M, GUARDIOLA F A, et al. Alteration of the immune response and the microbiota of the skin during a natural infection by *Vibrio harveyi* in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Microorganisms, 2021, 9(5): 964.
- [5] 张晓, 高圣华, 金敏, 等. 饮用水中病毒的富集和检测技术概述[J]. 中国给水排水, 2020, 36(8): 50-55.
- [6] ZHANG X, GAO S H, JIN M, et al. Overview of virus enrichment and detection techniques in drinking water [J]. China Water & Wastewater, 2020, 36(8): 50-55.
- [7] 王珊珊, 闫君, 杜彤彤, 等. 基于CRISPR-Cas12a的环介导等温核酸扩增技术在SARS-CoV-2病毒检测中的应用[J]. 武汉大学自然科学学报, 2024, 29(5): 453-460.
- [8] WANG S S, YAN J, DU T T, et al. Detection of SARS-CoV-2 and its mutated variants using RT-LAMP-CRISPR-Cas12a platform [J]. Wuhan University Journal of Natural Sciences, 2024, 29(5): 453-460.
- [9] 许琰, 冯育芳, 王卫, 等. TaqMan探针实时荧光定量RT-PCR法检测SIV/SHIV病毒RNA拷贝数方法的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(2): 92-95.
- [10] XU Y, FENG Y F, WANG W, et al. Quantitation of simian immunodeficiency virus (SIV) and SHIV virus RNA load using real-time quantitative RT-PCR with TaqMan probe [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2007, 17(2): 92-95.
- [11] ZHANG Y, HUNG T, SONG J D, et al. Electron microscopy: essentials for viral structure, morphogenesis and rapid diagnosis [J]. Science China Life Sciences, 2013, 56(5): 421-430.
- [12] 侯敏, 丁珵, 邓富昌, 等. 城市污水中诺如病毒两种富集浓缩方法的比较研究[J]. 环境卫生学杂志, 2023, 13 (5): 357-362.
- [13] HOU M, DING C, DENG F C, et al. Two enrichment methods for norovirus in urban sewage: a comparative study [J]. Journal of Environmental Hygiene, 2023, 13 (5): 357-362.
- [14] KEMPER M A, VEENMAN C, BLAAK H, et al. A membrane filtration method for the enumeration of *Escherichia coli* in bathing water and other waters with high levels of background bacteria [J]. Journal of Water and Health, 2023, 21(8): 995-1003.
- [15] 梁红茹, 黄瑜聪, 付小哲, 等. 鳜蛙病毒及鳜弹状病毒双重PCR检测方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(3): 290-295.
- [16] LIANG H R, HUANG Y C, FU X Z, et al. Development of a duplex PCR for the detection of *Siniperca chuatsi* ranairidovirus and *Siniperca chuatsi* rhabdovirus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2021, 43(3): 290-295.
- [17] COLOMBET J, ROBIN A, LAVIE L, et al. Viriplankton ‘pegylation’: use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 71(3): 212-219.
- [18] HATA A, MATSUMORI K, KITAJIMA M, et al. Concentration of enteric viruses in large volumes of water using a cartridge-type mixed cellulose ester membrane [J]. Food and Environmental Virology, 2015, 7(1): 7-13.
- [19] 阳海怡, 江慧敏, 曾会玲, 等. 基于磁珠吸附的污水病毒高通量富集方法研究[J]. 病毒学报, 2023, 39(6): 1623-1632.
- [20] YANG H Y, JIANG H M, ZENG H L. Study on a high-throughput enrichment method for sewage virus based on magnetic beads adsorption [J]. Chinese Journal of Virology, 2023, 39(6): 1623-1632.
- [21] 梁莎, 谢广成, 徐子乾, 等. 环境水体中G II型诺如病毒浓缩研究[J]. 病毒学报, 2011, 27(1): 58-63.
- [22] LIANG S, XIE G C, XU Z Q, et al. Study on concentration of nuorovirus genegroup II from environmental water [J]. Chinese Journal of Virology, 2011, 27(1): 58-63.
- [23] 余昆英, 师舞阳, 陈子龙, 等. 水中诺如病毒富集效果及核酸提取方法的比较[J]. 南昌大学学报(医学版), 2014, 54(12): 28-30.
- [24] XU K Y, SHI W Y, CHEN Z L, et al. Concentration of Noroviruses from water and extraction of nucleic acids [J]. Journal of Nanchang University (Medical Sciences), 2014, 54(12): 28-30.
- [25] BAI Y L, PU C M, SUO Y J, et al. Exploring magnetic capture to improve the detection of human norovirus in strawberries [J]. Food Frontiers, 2023, 4(4): 1819-1830.

Application of nucleic acid enrichment technology in culture water for the detection of iridovirus in Mandarin fish ranavirus and evaluation of its performance

XU Tonghui^{1,2,3}, REN Xinyu^{1,2,3}, REN Yilin^{1,2,3}, ZHANG Junzhe⁴, WENG Shaoping⁴, XU Dan^{1,2,3}, WANG Shuran⁵

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. State Key Laboratory of Biological Control, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China; 5. Liaoning Key Laboratory of Aquatic Animal Disease Prevention and Control, Liaoning Institute of Freshwater Aquatic Sciences, Liaoyang 111000, Liaoning, China)

Abstract: The aim of this study was to develop a magnetic bead enrichment-based method for the detection of Mandarin fish ranavirus in culture water. The results showed that the method was effective in enriching Mandarin fish ranavirus in culture water samples, and specific bands could be obtained by conventional PCR amplification. Quantitative analysis showed that the sensitivity of the magnetic bead enrichment method combined with real-time fluorescence quantitative PCR reached the detection limit of 0.01 copies/ μL . Feasibility analysis demonstrated that the magnetic bead enrichment method had 90% concordance with qPCR results and was suitable for fully automated nucleic acid detection platforms. Compared with the traditional qPCR method, this method has better anti-interference ability and ease of operation while maintaining high detection consistency. The detection technology developed in this study is characterized by easy operation and high sensitivity, which provides reliable technical support for the monitoring of aquaculture water pathogens and early warning, and is of great practical significance for the prevention and control of aquaculture diseases.

Key words: Mandarin fish ranavirus; aquaculture water body; virus detection; magnetic bead method