

文章编号: 1674 - 5566(2012)01 - 0054 - 06

## 罗氏沼虾诺达病毒套式 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用

童桂香<sup>1</sup>, 黎小正<sup>1</sup>, 卢小花<sup>1</sup>, 廖永志<sup>1</sup>, 江林源<sup>1</sup>, 韦信贤<sup>1,2</sup>

(1. 广西水产研究所, 广西南宁 530021; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 罗氏沼虾诺达病毒 (*Macrobrachium rosenbergii nodavirus*, *MrNV*) 是世界动物卫生组织规定必需上报的罗氏沼虾白尾病 (white tail disease, WTD) 的主要病原体。为建立快速检测 *MrNV* 的套式 RT-PCR 方法, 根据 GenBank 上发表的 *MrNV* 衣壳蛋白基因序列设计 2 对特异性引物, 对 PCR 条件进行优化后通过特异性试验和敏感性试验检测其特异性和敏感性。结果表明: 该方法能特异地扩增出 205 bp 的 *MrNV* 衣壳蛋白基因片段, 最佳引物浓度为 0.8  $\mu\text{mol/L}$ 、退火温度为 56  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 2.0 mmol/L, 而对其他对虾病毒基因组均没有扩增出条带; 检测 *MrNV* 的灵敏度大约为 RT-PCR 的  $10^3$  倍, 最低可检测到  $2.612 \times 10^{-2}$  fg *MrNV* RNA。应用套式 RT-PCR 和一步法 RT-PCR 同时对 108 份来自广西各地的罗氏沼虾临床样品进行检测, 其中套式 RT-PCR 共有 9 份检出 *MrNV*, 而一步法 RT-PCR 仅有 3 份检出 *MrNV*。由此可见, 建立的套式 RT-PCR 检测方法具有极高的特异性和敏感性, 能提高 *MrNV* 的阳性检出率, 可用于 *MrNV* 急性感染和隐性感染的早期诊断, 为 WTD 的临床检测、流行病学调查、进出口检疫和实验室研究提供可靠的技术手段。

**研究亮点:** 根据 GenBank 上发表的 *MrNV* 衣壳蛋白基因序列设计 2 对特异性引物, 优化建立了检测 *MrNV* 的套式 RT-PCR 方法。该方法具有极高的特异性和敏感性, 最低可检测到  $2.612 \times 10^{-2}$  fg *MrNV* RNA, 能提高临床样品 *MrNV* 的阳性检出率, 可用于 *MrNV* 急性感染和隐性感染的早期诊断。

**关键词:** 罗氏沼虾诺达病毒; 白尾病; 衣壳蛋白基因; 套式 RT-PCR; 快速检测

**中图分类号:** S 945.4

**文献标志码:** A

罗氏沼虾白尾病 (White tail disease, WTD) 又称肌肉白浊病、白体病, 主要危害罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 苗种, 尤其是淡化后的仔虾; 患病虾苗出现肌肉白浊、白斑或白尾症状, 可在较短时间内大量死亡, 虾池中累积死亡率一般为 30% ~ 70%, 严重的达 90% 以上<sup>[1-2]</sup>。WTD 最早由 NASH 等<sup>[3]</sup> 在泰国率先报道, 随后逐渐波及到中国台湾、法属瓜特罗普岛 (Guadeloupe) 和安替列群岛 (Antillan) 以及中国大陆地区<sup>[4-6]</sup>。在我国, WTD 最早于 1996 年前后出现在广东、广西一带, 以后迅速传播到江苏、浙江等地, 2001 年起在全国主要罗氏沼虾苗种场广泛流行, 成为罗氏沼虾苗种业和养殖业的主要威胁<sup>[7]</sup>。该病流行广、发病快、死亡率高, 严重制

约着罗氏沼虾养殖业的健康发展, 被世界动物卫生组织 (OIE) 列为必须申报的疾病<sup>[8]</sup>。

WTD 的病原为罗氏沼虾诺达病毒 (*Macrobrachium rosenbergii nodavirus*, *MrNV*) 和极小病毒 (Extra small virus, XSV) 两种病毒, 但 XSV 在病原性方面扮演的角色还不清楚, 而 *MrNV* 在 WTD 的爆发中发挥着重要的作用<sup>[8]</sup>, 因此 *MrNV* 的快速检测对 WTD 的诊断有着更为重要的意义。目前国内外检测 *MrNV* 的方法主要有 ELISA、TAS-ELISA、原位杂交、RT-LAMP 及 RT-PCR 等<sup>[9-13]</sup>。ELISA 和原位杂交虽准确、可靠, 但存在不够敏感、检测所需时间长等不足, 不能满足临床快速检测 *MrNV* 的需要; RT-LAMP 虽灵敏、快速, 但容易交叉污染; 国内外所建立的 RT-

收稿日期: 2011-08-17 修回日期: 2011-10-13

基金项目: 广西科技攻关项目 (桂科攻 0992015 - 1)

作者简介: 童桂香 (1982—), 女, 助理工程师, 硕士, 研究方向为水产品的检验检疫和渔业病害防治。E-mail: tgx15@163.com

通讯作者: 韦信贤, E-mail: Byang15@126.com

PCR 检测方法都能从 *MrNV* 基因组中扩增出目的片段,但当病毒含量极其微量时难以检出。鉴于上述 *MrNV* 检测方法的局限性,本试验建立了 *MrNV* 套式 RT-PCR 检测方法,为罗氏沼虾 WTD 的临床快速准确诊断及罗氏沼虾苗种的 *MrNV* 检测提供可靠的技术手段,以便更有效地控制 WTD 的发生与流行。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

*MrNV* 阳性材料来自广西某个体罗氏沼虾育苗场,由本实验室收集、鉴定并保存;健康无 *MrNV* 罗氏沼虾采自国家级广西南宁罗氏沼虾良种场;Taura 综合征病毒 (TSV)、白斑综合征病毒 (WSSV) 和传染性皮下和造血器官坏死病毒

(IHNV) 阳性材料均由本实验室鉴定并保存;临床样品采自广西各地罗氏沼虾养殖场。

### 1.2 生化试剂

QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自 QIAGEN 公司; *Ex Taq* 聚合酶、One Step RNA PCR Kit、dNTPs、Agarose Gel DNA Purification Kit、DL1000 DNA Marker、pMD18-T 均购自宝生物工程(大连)有限公司。其它试剂均为分析纯。

### 1.3 引物设计

参考 GenBank 上 *MrNV* 多个分离株衣壳蛋白基因序列,选取同源性高且二级结构小的部位,利用 Oligo 6.0 软件设计套式 RT-PCR 引物(表 1)。将各个引物序列分别在 GenBank 上进行 BLAST,验证其序列特异性后交宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 *MrNV* 套式 RT-PCR 引物  
Tab.1 Primers of the nested RT-PCR for the detection of *MrNV*

引物名称	引物序列	扩增片段大小/bp
<i>MrNV</i> F1	5'-CGC-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG-3'	423
<i>MrNV</i> R1	5'-AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG-3'	
<i>MrNV</i> F2	5'-GAT-GAC-CCC-AAC-GTT-ATC-CT-3'	205
<i>MrNV</i> R2	5'-GTG-TAG-TCA-CTT-GCA-AGA-GG-3'	

### 1.4 RNA 的提取

取 50 ~ 100 mg 待检虾苗或成虾的鳃丝、肌肉组织,加 500  $\mu$ L TN 缓冲液 (20 mmol/L Tris/HCl, 0.4 mol/L NaCl, pH 7.4) 匀浆,离心取上清,采用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 按其说明书提取病毒 RNA,用核酸蛋白测定仪测定病毒 RNA 纯度及浓度,保存于 -80  $^{\circ}$ C 备用。

### 1.5 PCR 扩增及产物测序验证

第一轮 PCR 反应体系参照 One Step RNA PCR Kit 说明书执行。反应条件如下: 50  $^{\circ}$ C cDNA 合成 30 min; 94  $^{\circ}$ C 灭活反转录酶 2 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 最佳退火温度退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 参考外引物的解链温度 ( $T_m$ ), 在 ( $T_m \pm 5$ )  $^{\circ}$ C 的范围内进行最佳退火温度的筛选。第二轮 PCR 以第一轮产物为模板, 参考内引物的  $T_m$  值及试剂说明书, 对反应体系及反应参数进行优化。取第一轮及第二轮 PCR 产物于含核酸燃料的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 在凝胶成像系统上观察并记录结果。将两轮 PCR 阳性产物分别回收、克隆并送至宝生物工程(大连)有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI 进行 BLAST 搜索比对, 同时利用生物软件

进行序列分析。

### 1.6 套式 RT-PCR 特异性试验

分别提取健康无 *MrNV* 罗氏沼虾组织的 RNA 和 *MrNV*、TSV、WSSV 及 IHNV 4 种病毒的核酸进行套式 RT-PCR 扩增, 观察反应的特异性。

### 1.7 套式 RT-PCR 敏感性试验

提取并浓缩病料上清中的 *MrNV* RNA, 核酸蛋白测定仪测定浓度后作 10 倍梯度的倍比稀释, 分别取各梯度适量的 RNA 作为模板根据已筛选出的最佳反应程序和体系进行套式 RT-PCR 和一步法 RT-PCR, 比较并确定它们的敏感性。

### 1.8 套式 RT-PCR 的临床检测试验

用套式 RT-PCR 和一步法 RT-PCR 对 108 份临床样品进行检测, 以检验套式 RT-PCR 较一步法 RT-PCR 的优越性及其临床实用性。

## 2 结果

### 2.1 *MrNV* 套式 RT-PCR 的建立

以病料上清中提取的 *MrNV* 基因组 RNA 和健康罗氏沼虾组织总 RNA 分别作为模板, 参照 One Step RNA PCR Kit 说明书用外引物进行第一轮扩增; 再以第一轮产物为模板, 用内引物进行

第二轮扩增。电泳分析结果显示(图1),两轮反应均扩增出了与预期片段大小相符的长度分别为423 bp和205 bp的特异性条带,且条带清晰、无杂带,但第二轮产物形成的目的条带比第一轮的目的条带要强得多;而阴性对照健康罗氏沼虾组织总RNA未扩增出该片段。

将两轮PCR阳性产物分别回收、克隆测序,可分别得到423 bp(GenBank登录号为JN571287)和205 bp(GenBank登录号为JN571288)的目的片段。序列分析发现,所得核苷酸序列与引物设计模板序列(GenBank登录号为AY231437)对应片段同源性为99%。

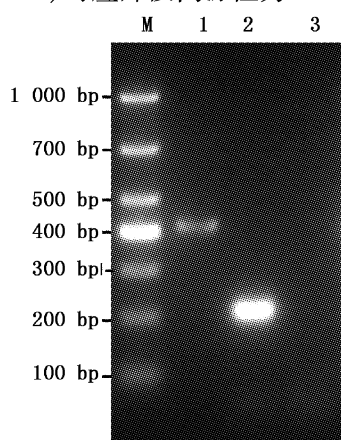


图1 一步法RT-PCR及套式RT-PCR的扩增结果

Fig.1 The results of one-step RT-PCR and nested RT-PCR

1. 第1轮扩增产物; 2. 第2轮扩增产物; 3. 阴性对照; M. DL1000 DNA marker。

## 2.2 *MrNV* 套式 RT-PCR 条件的优化

通过对不同反应条件下扩增结果比较,确定一步法RT-PCR的反应体系为:10 × One Step RNA PCR Buffer 2.5 μL、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5.0 μL、10 mmol/L dNTPs 2.5 μL、RNase Inhibitor(40 U/μL)0.5 μL、AMV RTase XL(5 U/μL)0.5 μL、AMV-Optimized Taq(5 U/μL)0.5 μL、20 μmol/L *MrNV* F1 和 *MrNV* R1 各1 μL、模板2 μL,加RNase Free dH<sub>2</sub>O至25 μL;反应条件如下:50 °C cDNA合成30 min;94 °C灭活反转录酶2 min;94 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,35个循环;最后72 °C延伸10 min;4 °C结束反应。套式PCR采用25 μL反应体系:10 × PCR buffer(无Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.0 μL、10 mmol/L dNTPs 0.5 μL、20 μmol/L *MrNV* F2 和

*MrNV* R2 各1 μL、*Ex Taq* 酶1.5 U、模板2 μL,加灭菌三蒸水至25 μL。PCR优化程序为:95 °C 5 min;94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 30 s,共30次循环;最后72 °C 10 min;4 °C结束反应。

## 2.3 *MrNV* 套式 RT-PCR 的特异性

分别以健康无*MrNV*罗氏沼虾组织RNA和*MrNV*、TSV、WSSV及IHHNV4种病毒的核酸为模板进行套式RT-PCR扩增,结果显示(图2),套式RT-PCR可以对*MrNV*的RNA进行扩增,并得到与预期大小一致的205 bp的特异性扩增产物;而对健康无*MrNV*罗氏沼虾组织RNA和TSV、WSSV及IHHNV3种对虾病毒基因组均没有扩增出条带。

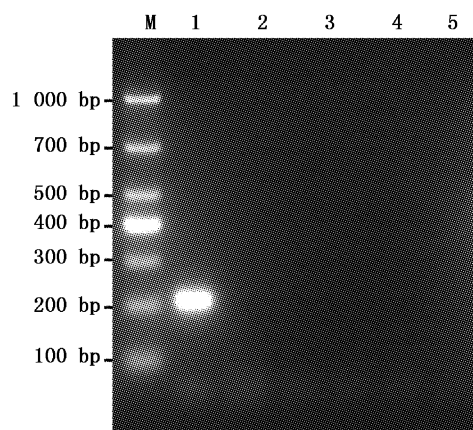


图2 套式RT-PCR的特异性检测

Fig.2 Specificity evaluation of the nested RT-PCR assay

1. *MrNV*; 2. TSV; 3. WSSV; 4. IHHNV; 5. 罗氏沼虾组织RNA; M. DL1000 DNA marker。

## 2.4 *MrNV* 套式 RT-PCR 的敏感性

经核酸蛋白测定仪测得浓缩后的病料上清液中提取的*MrNV* RNA含量为13.06 pg/μL。取2 μL不同稀释度的*MrNV* RNA为模板,按上述PCR最佳反应条件进行套式RT-PCR和一步法RT-PCR检测,结果显示(图3、图4),套式RT-PCR最低可检测到每个反应约2.612 × 10<sup>2</sup> fg的*MrNV*基因组RNA,而一步法RT-PCR最低可检测到每个反应约26.12 fg的*MrNV*基因组RNA。可见在检测*MrNV*时,套式RT-PCR比一步法RT-PCR更敏感,其灵敏度大约为一步法RT-PCR的10<sup>3</sup>倍。

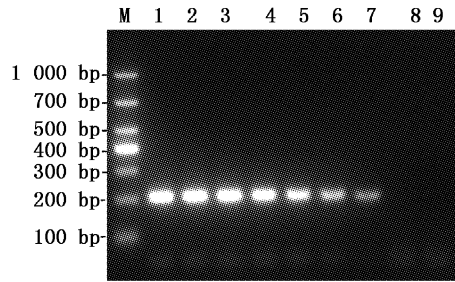


图3 套式 RT-PCR 的敏感性试验

Fig. 3 Sensitivity analysis of the nested RT-PCR

assay

M. DL1000 DNA marker; 1. 26. 12 pg; 2. 2. 612 pg; 3. 261. 2 fg; 4. 26. 12 fg; 5. 2. 612 fg; 6. 0. 261 2 fg; 7. 0. 026 12 fg; 8. 0. 002 612 fg; 9. 阴性对照。

## 2.5 临床检测结果

用套式 RT-PCR 和一步法 RT-PCR 对 108 份来自广西各地罗氏沼虾养殖场的临床样品进行检测,结果见表 2,套式 RT-PCR 共有 9 份检出 *MrNV*,总阳性率为 8.3%,其中虾苗 8 份,阳性率为 9.3%,成虾 1 份,阳性率为 4.5%;而一步法 RT-

PCR 仅 3 份有肌肉白浊、白尾等外观症状的虾苗样品检出 *MrNV*,总阳性率为 2.8%,虾苗样品阳性率为 3.5%,并且一步法 RT-PCR 检测为 *MrNV* 阳性的 3 份样品用套式 RT-PCR 均能检测出 *MrNV*。表明套式 RT-PCR 可提高 *MrNV* 的阳性检出率,较一步法 RT-PCR 有更大的应用价值。

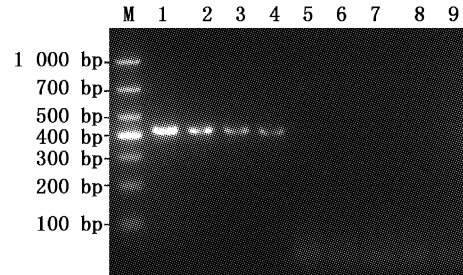


图4 一步法 RT-PCR 的敏感性试验

Fig. 4 Sensitivity analysis of the one-step RT-PCR

assay

M. DL1000 DNA marker; 1. 26. 12 pg; 2. 2. 612 pg; 3. 261. 2 fg; 4. 26. 12 fg; 5. 2. 612 fg; 6. 0. 2612 fg; 7. 0. 02612 fg; 8. 0. 002612 fg; 9. 阴性对照。

表2 套式 RT-PCR 和一步法 RT-PCR 对临床样品检测的结果

Tab. 2 Detection results of *MrNV* in clinical samples using nested RT-PCR and one-step RT-PCR

检测方法	样品数/份	阳性/份	阳性率/%
套式 RT-PCR	成虾 22 无肌肉白浊、白尾症状	1	4.5
	虾苗 3 有肌肉白浊、白尾症状	3	8.3
	虾苗 83 无肌肉白浊、白尾症状	5	9.3
一步法 RT-PCR	成虾 22 无肌肉白浊、白尾症状	0	0
	虾苗 3 有肌肉白浊、白尾症状	3	2.8
	虾苗 83 无肌肉白浊、白尾症状	0	3.5

## 3 讨论与分析

WTD 是近年来罗氏沼虾育苗和养殖的主要疾病,流行于我国罗氏沼虾主要养殖省市,特别是广西、广东和浙江等罗氏沼虾主要苗种生产地更是该病的重灾区。*MrNV* 是 WTD 的主要病原,罗氏沼虾苗种包括幼体和变态后的虾苗对其都高度易感,感染后多表现出肌肉白浊、白斑或白尾症状并可引起大量死亡;而罗氏沼虾成虾对 *MrNV* 具有较强的抵抗力,感染后更多的是表现为病毒携带状态,成为潜在的传染源。实验研究已证实 *MrNV* 可以从感染的亲虾垂直传播给虾苗<sup>[14]</sup>,因此带毒亲虾的使用和带毒苗种的跨区运输将可能继续扩大和加快该病的传播扩散,对罗氏沼虾养殖业带来严重的潜在威胁。因此,建立

一种灵敏、可靠的检测 *MrNV* 的方法,用于临床潜伏感染的罗氏沼虾亲虾和苗种的检测和检疫,并采取相应措施防止该病扩散,是生产中减少损失的有效途径。

虽然近年来陆续建立了一些 *MrNV* 的检测方法,包括病毒的电镜观察、核酸电泳法、TAS-ELISA 以及 RT-PCR 法等,但这些方法用于潜伏感染罗氏沼虾的病毒检测常存在不够敏感的缺陷。套式 RT-PCR 利用两套特异性引物对原始模板进行两轮 PCR 扩增反应,对模板进行了连续的放大,其特异性和灵敏度相对于一步法 RT-PCR 而言都有很大的提高<sup>[15]</sup>。本研究的特异性试验结果表明,建立的套式 RT-PCR 能对 *MrNV* 基因组 RNA 进行特异性扩增,而对健康无 *MrNV* 罗氏沼虾组织样品及其它对虾病毒基因组均无扩增

条带,说明该套式 RT-PCR 技术在 *MrNV* 的检测上具有高度的特异性;敏感性试验结果也显示,该套式 RT-PCR 检测 *MrNV* 的灵敏度大约为常规 RT-PCR 的  $10^3$  倍,最低可检测到每个反应约  $2.612 \times 10^{-2}$  fg 的 *MrNV* 基因组 RNA,如此高度的敏感性揭示着该技术可用于 *MrNV* 感染初期或潜伏期的亲虾、虾苗的检测和环境监测。

用一步法 RT-PCR 和套式 RT-PCR 对 86 份虾苗和 22 份成虾共 108 份来自广西各地罗氏沼虾养殖场的临床样品进行检测的结果表明,套式 RT-PCR 可明显提高 *MrNV* 的阳性检出率,有更好的临床实用性;同时说明近年来 *MrNV* 感染在广西各地罗氏沼虾养殖中有散在的流行,特别是虾苗的 *MrNV* 感染;有一例亲虾检出 *MrNV*,提示对亲虾进行 *MrNV* 的监测避免 *MrNV* 的垂直传播也很必要。此外,在对临床样品的检测过程中发现,一步法 RT-PCR 可检测出已表现肌肉白浊、白尾等外观症状的罗氏沼虾,但对无外观症状的罗氏沼虾很难检测出阳性结果;而套式 RT-PCR 则能检测出毫无外观症状潜伏感染 *MrNV* 的罗氏沼虾样品。因此,在 *MrNV* 感染初期或潜伏期的罗氏沼虾亲虾、虾苗的检测及检疫中,使用敏感性高的套式 RT-PCR 更为合适。

上述结果表明,本研究建立的套式 RT-PCR 具有特异、灵敏、对临床样品的检出率高等优点,可为 *MrNV* 的流行病学调查和诊断及进出口检疫提供可靠的技术手段。

#### 参考文献:

- [1] 陆宏达,陈海清. 罗氏沼虾肌肉白浊病的病原和组织病理[J]. 中国水产科学,2003,10(2):126-132.
- [2] 夏冬. 罗氏沼虾育苗期白尾病(白浊病)的防治方法[J]. 科学养鱼,2001(4):48.
- [3] NASH G, CHINABUT S, LIMSUWAN C. Idiopathic muscle necrosis in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, cultured in Thailand[J]. Journal of Fish Diseases,1987, 10(2): 109-120.
- [4] CHENG W, CHEN J C. Isolation and characterization of an Enterococcus-like bacterium causing muscle necrosis and mortality in *Macrobrachium rosenbergii* in Taiwan [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1998, 34(2): 93-101.
- [5] ARCIER J M, HERMAN F, LIGHTNER D V, et al. A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1999, 38(3): 177-181.
- [6] 姜兰,邓国成,石存斌,等. 罗氏沼虾肌肉白浊病原研究[J]. 水生生物学报,2002,26(5):477-482.
- [7] 周鑫. 罗氏沼虾肌肉白浊病[J]. 科学养鱼,2001(s):60-62.
- [8] Office International Des Epizooties. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals[M]. Paris: OIE, 2009: 132-143.
- [9] ROMESTAND B, BONAMI J R. A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of *MrNV* in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) [J]. Journal of Fish Diseases, 2003, 26(2): 71-75.
- [10] 钱冬,刘问,潘晓艺,等. 罗氏沼虾诺达病毒 TAS-ELISA 检测法的建立及应用研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2006,32(4):377-382.
- [11] SRIWIDADA J, DURAND S, CAMBOURNAC Q D, et al. Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, in situ hybridization and RT-PCR [J]. Journal of Fish Diseases, 2003, 26(10): 583-590.
- [12] PILLAI D, BONAMI J R, SRIWIDADA J. Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), by loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Fish Diseases, 2006, 29(5): 275-283.
- [13] 曾地刚,雷爱莹. 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测罗氏沼虾诺达病毒[J]. 广西农业科学,2006,37(6):735-737.
- [14] SUDHAKARAN R, ISHAQAHMED V P, HARIBABU P, et al. Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*[J]. Journal of Fish Diseases,2007, 30(1): 27-35.
- [15] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京:人民军医出版社,1995:304-305.

## Establishment and preliminary application of a nested RT-PCR for the detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus

TONG Gui-xiang<sup>1</sup>, LI Xiao-zheng<sup>1</sup>, LU Xiao-hua<sup>1</sup>, LIAO Yong-zhi<sup>1</sup>, JIANG Lin-yuan<sup>1</sup>, WEI Xin-xian<sup>1,2</sup>

(1. Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, Guangxi, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) was the main pathogen of white tail disease (WTD), which was defined as the notifiable disease of aquatic animals by Office International des Epizooties (OIE). The purpose of this study is to develop a nested RT-PCR method for the detection of *MrNV*. Two pairs of specific primer were designed and synthesized according to the published *MrNV* capsid protein gene sequence in GenBank. After the nested RT-PCR method was optimized, the specificity and sensitivity were assayed. This method can produce 205 bp amplicons of *MrNV* capsid protein gene with the following conditions: 0.8  $\mu\text{mol/L}$  optimal concentration of primer, 56  $^{\circ}\text{C}$  anneal temperature and 2.0  $\text{mmol/L}$   $\text{Mg}^{2+}$  concentration, and had no cross-reaction with three other prawn pathogens such as taura syndrome virus (TSV), white spot syndrome virus (WSSV) and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV). The results of sensitivity test showed that the nested RT-PCR was  $10^3$  times more sensitive than that of one-step RT-PCR, and the minimum detection limits of the nested RT-PCR were  $2.612 \times 10^{-2}$  fg *MrNV* RNA. 108 clinical *Macrobrachium rosenbergii* samples from Guangxi were tested by the two RT-PCR, and 9 out of 108 samples were positive by nested RT-PCR, while 3 out of 108 samples by one-step RT-PCR, which showed that the nested RT-PCR can boost positive detection rate of *MrNV*. The results indicated that the nested RT-PCR method for the detection of *MrNV* was successfully established and this method has high specificity and sensitivity, and could be used for the early diagnosis of acute and latent infections of *MrNV*. This study provides a reliable way for clinical detection, epidemiological investigation, import and export quarantine and laboratory studies on *MrNV*.

**Key words:** *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus; white tail disease; capsid protein gene; nested RT-PCR; rapid detection