DOI: 10.3969/j.issn.2095-9869.20250221001　　http://www.yykxjz.cn/

李淼, 许尤厚, 谢瑾琨, 刘明珠, 黄静, 常彦磊, 许伟江, 黄琳, 韩书煜, 余庆, 李鹏飞. 基于核酸适配体 TNA1c 构建靶标激活式探针用于特异性检测石斑鱼神经坏死病毒的感染. 渔业科学进展, 2026, 47(1): 161–171

LI M, XU Y H, XIE J K, LIU M Z, HUANG J, CHANG Y L, XU W J, HUANG L, HAN S Y, YU Q, LI P F. Construction of a target-activatable aptamer TNA1c for specific detection of grouper nervous necrosis virus infection. Progress in Fishery Sciences, 2026, 47(1): 161–171

基于核酸适配体 TNA1c 构建靶标激活式探针用于特异性检测石斑鱼神经坏死病毒的感染*

李　淼[1,2]　许尤厚[1]　谢瑾琨[2]　刘明珠[2]　黄　静[2]　常彦磊[3]
许伟江[4]　黄　琳[2]　韩书煜[5]　余　庆[2①]　李鹏飞[1,2]

(1. 北部湾大学海洋学院　广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室　广西　钦州　535011；
2. 广西科学院　广西海洋科学院　广西水产生物技术与现代生态养殖重点实验室
广西壮族自治区渔业重大疫病防控与高效健康养殖产业技术工程研究中心　广西　南宁　530007；
3. 广东双螺旋基因技术有限公司　广东　广州　511453；4. 广东海洋大学水产学院　广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室　广东　湛江　524088；5. 广西壮族自治区水产技术推广站　广西　南宁　530199)

摘要　石斑鱼神经坏死病毒(Nervous necrosis virus, NNV)作为石斑鱼养殖中最具破坏力的病毒性病原之一，对石斑鱼养殖业造成严重威胁，其引发的病毒性神经坏死病(viral nervous necrosis, VNN)会导致仔鱼和幼鱼大规模死亡。因此，需开发具备现场快速响应能力、操作便捷且兼具高灵敏度和特异性的新型检测技术，满足 NNV 早期诊断和精准防控的迫切需求。核酸适配体 TNA1 能够高特异性识别 NNV 感染细胞，本研究通过对 TNA1 进行结构改造和化学修饰，创新性地构建出一种靶标激活式核酸适配体探针(target-activatable aptamer TNA1c, TNA1c-TAA)。利用流式细胞术、激光共聚焦技术以及实时荧光定量 PCR (qPCR)技术，对 TNA1c-TAA 的特异性、灵敏性、稳定性进行分析，结果发现，TNA1c-TAA 能够高特异性地识别 NNV 感染的细胞，不识别其他病毒感染的细胞。TNA1c-TAA (500 nmol/L)在 4~28 ℃范围内，能够在 1 min 内精准检测到 1×10^3 个 NNV 感染的细胞。活体水平检测结果显示，TNA1c-TAA 可以特异性识别 NNV 感染的石斑鱼脑组织细胞，TNA1c-TAA 检测样品的阳性率与 qPCR 检测结果一致，证实 TNA1c-TAA 具有应用于石斑鱼养殖中 NNV 感染快速诊断的潜力，为构建水产疫病“预防-诊断-控制”三位一体防控体系奠定了理论基础。

关键词　石斑鱼；神经坏死病毒；快速检测技术；核酸适配体；靶标激活式探针

中图分类号　S965.334　**文献标识码**　A　**文章编号**　2095-9869(2026)01-0161-11

石斑鱼是我国重要的经济鱼类，近年来随着养殖规模迅速扩大、养殖密度不断增加，病害反复大规模暴发(Húsgağ *et al*, 2001; Liu *et al*, 2024b; Zhou *et al*, 2016; Yu *et al*, 2019a)。其中，石斑鱼神经坏死病毒

* 广西自然科学基金(AD23026331; 2022JJA130281; 2023GXNSFAA026325)、国家重点研发计划(2022YFD2401200)和广西科技项目(GUIKEFA[2024]102-2)共同资助。李　淼，Email: 2912829909@qq.com

① 通信作者：余　庆，副研究员，Email: yuqing@gxas.cn

收稿日期: 2025-02-21, 收修改稿日期: 2025-04-18

(nervous necrosis virus, NNV)是最具破坏性的传染性病原之一。NNV 主要破坏石斑鱼的神经系统，靶器官为脑和眼，感染 NNV 后，石斑鱼会出现打转、漂水、体色变深、通体发黑等症状，一周内死亡率可达100%。该病毒的暴发严重威胁着石斑鱼养殖业的健康可持续发展(Munday *et al*, 2002; Nishizawa *et al*, 2008; Li *et al*, 2020)。

目前，针对 NNV 的防控手段仍存在明显不足。尽管研究表明，谷氨酰胺(沈海洋等, 2020)、大黄酸(Liu *et al*, 2024a)等活性化合物能够抑制 NNV 的早期感染，但这些发现尚处于实验研究阶段，未能实现大规模的应用。由于目前市场上缺少治疗水产病毒病的有效药物，因此，控制水产病毒病暴发的关键在于病毒感染早期进行快速精准检测，并辅以免疫增强剂提高鱼体免疫力，从而有效控制病毒传播(Song *et al*, 2024; Hou *et al*, 2025)。在病原诊断方面，目前主要采用组织病理学观察法、免疫学检测以及实时荧光定量 PCR (qPCR)等方法(Shi *et al*, 2003; Qi *et al*, 2005; 张梦兰等, 2021; Chinchar *et al*, 2009; 彭智发, 2015)。这些技术具有灵敏度高、特异性强等优势，但均存在一定的局限性：组织病理学观察法灵敏度较低且耗时长，易造成 NNV 早期或轻度感染的漏诊(Zhou *et al*, 2016)；基于抗体的 ELISA 检测技术，因抗体的合成周期长，且批次间存在不稳定性，正逐渐被分子技术所取代(Huang *et al*, 2001)；qPCR 检测技术具有极高的检测灵敏度，但其对精密仪器、专业试剂和技术人员的严苛要求限制了应用场景(汪琼等, 2023)。现有的这些检测方法难以满足 NNV 的现场快速检测的实际需求，因此，开发一种操作便捷、准确性高、耗时短的 NNV 快速检测技术已成为当前亟待解决的行业难题。

核酸适配体(aptamer)是利用指数富集的配基系统进化技术(SELEX)，将人工合成的、容量约为 10^{14}~10^{15} 的随机寡核苷酸文库与靶物质结合，经过多轮筛选获得能够特异性识别靶物质的单链核酸(余庆等, 2020; Yu *et al*, 2021; 李鹏飞等, 2024)。核酸适配体通过链内碱基间的氢键作用折叠形成稳定的发卡、茎环、假结、凸环和 G-四链体等结构，并与靶标特异性结合(Stoltenburg *et al*, 2007)。核酸适配体的相对分子质量小，具有易穿透细胞膜、性质稳定、容易化学合成和修饰等特点(Zhou *et al*, 2016)。近年来，核酸适配体在水产病害检测领域取得显著进展并得到广泛应用(Li *et al*, 2014; 李鹏飞等, 2024; 张帅帅等, 2024)。Zhou 等(2017)针对 RGNNV 衣壳蛋白(CP)筛选得到的核酸适配体具有抗病毒效果，并基于其特异性开发出“核酸适配体-CP 蛋白-核酸适配体”的夹心酶联核酸适配体吸附检测技术(ELASA)，该方法具有耗时短、特异性强和稳定性高等优点。目前，基于核酸适配体开发的新型检测技术用于病害的快速准确检测诊断，已在石斑鱼虹彩病毒(SGIV) (Li *et al*, 2014)、卵形鲳鲹源神经坏死病毒(GPNNV) (许海东等, 2010)、草鱼呼肠孤病毒(GCRV) (Yu *et al*, 2020)、大口黑鲈虹彩病毒(LMBV) (张帅帅等, 2024; Zhang *et al*, 2022)、中华鳖虹彩病毒(STIV) (朱春华等, 2009)、致病性溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) (余庆等, 2018)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*) (刘慧敏等, 2020)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) (周伶俐等, 2018)以及有害藻华棕囊藻(*Phaeoecystis globosa*) (江天久等, 2006)等病原的研究中获得成功。

本研究针对核酸适配体在水产养殖监测应用中存在的技术瓶颈展开探索。现有检测技术因清洗不彻底导致的高背景信号问题，严重制约了其在养殖现场的规模化应用。为解决这一难题，本研究通过引入靶标激活式分子探针技术(target-activatable aptamer, TNA1c-TAA)，构建了一种新型检测体系。该技术采用双功能修饰探针设计：该探针首先加上一段 T 链和用于氢键结合的 C 链，然后在核酸适配体两端分别标记荧光基团 FAM (carboxyfluorescein)和猝灭基团 BHQ1 (black hole quencher 1)。在非靶标状态下，FAM 与 BHQ1 通过空间邻近效应形成荧光共振能量转移(FRET)机制，导致荧光信号被有效猝灭。当靶标物质与核酸适配体特异性结合后，分子探针发生构象改变，致使荧光基团与猝灭基团的空间距离超出有效猝灭半径，这种构象变化使荧光得以恢复。本研究中的创新设计，相比“always on”的荧光探针背景值明显降低，能有效克服现场检测中的背景干扰难题，实现对 NNV 的快速检测，同时为水产养殖病害防控提供新思路和新方案。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验室所用细胞系为石斑鱼鳍细胞(grouper fin cell, GF-1)，在 28 ℃条件下用添加 10%胎牛血清(FBS; Gibco, Grand Island, 美国)的 Leibovitz's L15 (Gibco)培养基培养。实验所用病毒为石斑鱼神经坏死病毒广西株(Nervous necrosis virus Guangxi, NNV)、石斑鱼虹彩病毒广西株(Singapore grouper iridovirus Guangxi, SGIV)，SGIV 和 NNV 均是本实验室前期从广西某养殖场患病的珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus* ♂)中分离获得(Xiao *et al*, 2019; Yu *et al*, 2019b)，并保存在液氮中。

1.2 方法

1.2.1 TNA1c-TAA 的制备　靶标激活式核酸适配体探针由 3 个片段组成：一段是靶向识别的核酸适配体序列，用于特异性识别靶标，另一段是延伸的间隔片段 T 链，第 3 段是使适体呈发夹结构的 C 链，使 5′端的猝灭剂 BHQ1 与 3′端的荧光团 FAM 无限接近，本研究根据此原理设计了 TNA1c-TAA 系列探针(表 1)。核酸适配体及所用引物均由奥科(武汉)生物科技有限公司合成。本研究使用的核酸适配体探针在使用前均进行 92 ℃水浴 5 min、冰浴 5 min 处理。

表 1　本研究所涉及的序列
Tab.1　Sequences used in this study

名称 Name	序列 Sequence
TNA1c1-TAA	5′-FAM-CCAACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCTCGGGGCTCGAT ATTGTAAAGGGAGTGTGTTTAGGAGGACGTGGTTGG-BHQ1-3′
TNA1c2-TAA	5′-FAM-CCAACCATTTTTTTTTTTTTTTTTGCTCGGGGCTCGAT ATTGTAAAGGGAGTGTGTTTAGGAGGACGTGGTTGG-BHQ1-3′
TNA1c3-TAA	5′-FAM-CCAACCACTTTTTTTTTTTTTTTTGCTCGGGGCTCGATA TTGTAAAGGGAGTGTGTTTAGGAGGACGTGGTTGG-BHQ1-3′
TNA1c4-TAA	5′-FAM-CCAACCACGTTTTTTTTTTTTTTTGCTCGGGGCTCGAT ATTGTAAAGGGAGTGTGTTTAGGAGGACGTGGTTGG-BHQ1-3′
FAM- TNA1c	5′-FAM-GCTCGGGGCTCGATATTGTAAAGGGAGTGTGTTTAGGAGGACGTGGTTGG -3′
CP-F	5'-CTGCTAGAATCTTCCAGCGATA-3'
CP-R	5'-TGTCAGTTGGATCAGGCAGGAA-3'
β-actin-F	5'-ACGAGCTGCCTGACGGACA-3'
β-actin-R	5'-GGCTGTGATCTCCTTCTGCA-3'

1.2.2 流式细胞术分析 TNA1c 检测 NNV 感染细胞的特异性　GF-1 细胞接入 6 cm 细胞培养皿，28 ℃培养 18 h，皿底基本铺满细胞。实验组细胞中接入 NNV (MOI=0.4)，对照组 1 为仅加入无血清 L15 培养基的 GF-1 细胞，对照组 2 细胞中接入 SGIV (MOI=0.4)。各组细胞在 28 ℃培养 48 h，3 000 *g* 离心 3 min 收集细胞。将 FAM 标记的核酸适配体 TNA1c (500 nmol/L)加入到各组细胞中，冰浴 30 min，用 PBS 洗涤 3 次，使用流式细胞仪检测荧光值。每个反应均为 3 个重复。

1.2.3 激光共聚焦显微观察 TNA1c 识别结合 NNV 感染细胞的特异性　GF-1 细胞接入 35 mm 玻底皿，28 ℃培养 18 h，皿底基本铺满细胞。实验组细胞中接入 NNV (MOI=0.4)，对照组 1 为仅加入无血清 L15 培养基的 GF-1 细胞，对照组 2 细胞中接入 SGIV (MOI=0.4)。各组细胞在 28 ℃培养 48 h，然后将 FAM 标记的核酸适配体 TNA1c (500 nmol/L)加入各组细胞中，冰浴避光结合 30 min，各组细胞中加入 100 μL Hoechst 33342 染液避光染色 15 min，移除上清液并用 PBS 洗涤 3 次，最后各组细胞中加入 100 μL 无色 MEM，激光共聚焦显微镜下观察细胞并拍照。

1.2.4 TNA1-TAA 的最佳结构分析　细胞培养、收集同 **1.2.2**。分别将 5 种探针(FAM-TNA1c, TNA1c1-TAA, TNA1c2-TAA, TNA1c3-TAA, TNA1c4-TAA, 500 nmol/L)加入各组细胞中，冰浴 30 min，用 PBS 洗涤 3 次，使用流式细胞仪检测荧光值。每个反应均为 3 个重复。

1.2.5 TNA1c1-TAA 的最适工作浓度分析　GF-1 细胞接入 6 cm 细胞培养皿，28 ℃培养 18 h，皿底基本铺满细胞。实验组细胞中接入 NNV (MOI=0.4)，对照组 1 为仅加入无血清 L15 培养基的 GF-1 细胞。各组细胞在 28 ℃培养 48 h，3 000 *g* 离心 3 min 收集细胞。将稀释成不同浓度的 TNA1c1-TAA (1 000, 500, 250, 125, 62.5 nmol/L)分别加入各组细胞中，冰浴 30 min，用 PBS 洗涤 3 次，使用流式细胞仪检测荧光值。每个反应均为 3 个重复。

1.2.6 TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染细胞的数量敏感性分析　细胞培养、收集同 **1.2.5**。将细胞梯度稀释成不同数目(1×10^5, 5×10^4, 1×10^4, 5×10^3, 1×10^3, 5×10^2 个)，然后将核酸适配体探针 TNA1c1-TAA (500 nmol/L)分别加入各组细胞中，冰浴 30 min，用 PBS 洗涤 3 次，使用流式细胞仪检测荧光值。每个反应均为 3 个重复。

细胞分组同上，将细胞梯度稀释成不同数目(1×10^5, 5×10^4, 1×10^4, 5×10^3, 1×10^3, 5×10^2 个)加入

TriZol 试剂，用提取总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，利用反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA，以 cDNA 为模板，以 *β-actin* 基因作为内参基因，测定 NNV 的 CP 基因表达量，用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组间 CP 基因表达差异。每个样本检测为 3 次重复。

1.2.7 *TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染细胞的时间敏感性分析* 细胞培养、收集同 **1.2.5**。将核酸适配体探针 TNA1c1-TAA (500 nmol/L)分别加入各组细胞中，分别孵育结合 30、20、10、5、1 min，用 PBS 洗涤 3 次，使用流式细胞仪检测荧光值。每个反应均为 3 个重复。

1.2.8 *TNA1c1-TAA 的稳定性分析* 细胞培养、收集同 **1.2.5**。将核酸适配体探针 TNA1c1-TAA (500 nmol/L)分别加入各组细胞中，分别在 37、28、16、4 ℃下孵育结合 20 min，用 PBS 洗涤 3 次，使用流式细胞仪检测荧光值。每个反应均为 3 个重复。

1.2.9 *探针 TNA1c1-TAA 与 qPCR 在活体水平的检测结果比较分析* 检测所用样品来自广西防城港的某石斑鱼养殖场，在该厂暴发疫病时，取 20 尾出现打转、体色变黑等患病症状的石斑鱼，作为实验组，其中对照组为正常石斑鱼，将样品进行解剖取脑组织，使用剪刀将组织样品剪碎后用尼龙网过滤，收集到滤液即为待测样品。取 100 μL 待测样品加入 500 nmol/L 已变性的 TNA1c1-TAA，室温孵育 20 min，PBS 洗涤 3 次，用尼龙网过滤，用流式细胞仪检测荧光值。每组 3 个重复。

取 100 μL 待测样品加入 TriZol 试剂，用提取总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，利用反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA，以 cDNA 为模板，以 *β-actin* 基因作为内参基因，测定 NNV 的 CP 基因表达量，用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组间 CP 基因表达差异。每个样本检测 4 次。

2 结果

2.1 TNA1c 特异性识别结合 NNV 感染的细胞

如图 1a 所示，正常 GF-1 细胞呈长梭形、细胞排列紧密，SGIV 感染的细胞(GF-1-SGIV)出现明显的细胞病变，包括细胞皱缩、变圆、漂起等，NNV 感染的细胞(GF-1-NNV)内部出现明显空泡。流式细胞术(图 1b)和激光共聚焦技术(图 1c)检测结果均显示，FAM-TNA1c 能够特异性识别结合 NNV 感染的靶细胞，而对正常细胞、其他病毒感染的细胞无明显识别结合。

2.2 TNA1-TAA 的最佳结构分析

4 种靶标驱动激活式核酸适配体分子探针 TNA1c1-TAA、TNA1c2-TAA、TNA1c3-TAA、TNA1c4-TAA，特异性识别结合 NNV 感染细胞的结果如图 2 所示，与对照组相比，5 种探针均可特异性识别结合 NNV 感染细胞，其中，TNA1c1-TAA 探针结合靶细胞的能力最强，后续分析中均使用 TNA1c1-TAA。

2.3 TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染的特异性分析

最佳结构的核酸适配体 TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染的特异性分析如图 3 所示，TNA1c1-TAA 能够特异性识别结合 NNV 感染的 GF-1 (靶细胞)，而对正常 GF-1 细胞、SGIV 感染的 GF-1 细胞(GF-1-SGIV；非靶细胞)无明显识别结合。

2.4 TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染的工作浓度分析

探针 TNA1c1-TAA 的最适工作浓度分析如图 4 所示，不同浓度的核酸适配体探针 TNA1c1-TAA (1000, 500, 250, 125, 62.5 nmol/L)均特异性识别结合 NNV 感染的 GF-1 (靶细胞)，而且荧光值随着探针浓度的增加而升高。综合考虑探针的制备成本和荧光强度，后续分析中 TNA1c1-TAA 的浓度选用 500 nmol/L。

2.5 TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染的数量灵敏性分析

探针 TNA1c1-TAA 的检测 NNV 感染细胞的数量敏感性结果如图 5 所示，TNA1c-TAA (500 nmol/L)能够检测到 1×10^3 个 NNV 感染的细胞(图 5a)，该结果与 qPCR 检测结果一致(图 5b)，证实 TNA1c-TAA 具有应用于石斑鱼养殖中 NNV 精准诊断的潜力。

2.6 TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染的时间敏感性分析

探针 TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染细胞的时间敏感性分析结果如图 6 所示，随着 TNA1c1-TAA 与 NNV 感染细胞孵育时间的增加，荧光值持续升高，在孵育时间为 20 min 时，NNV 感染细胞上检测到的荧光值最高。并且在孵育时间短至 1 min 时，TNA1c-TAA (500 nmol/L)能够精准检测到 NNV 的感染。

2.7 TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染的稳定性分析

探针 TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染细胞的稳定性分析结果如图 7 所示，TNA1c1-TAA 与 NNV 感染细胞孵育温度的升高，荧光值也在不断升高，但在 37 ℃时，对照组细胞的荧光值也显著增加，推测此时可能细胞出现破损，导致 TNA1c1-TAA 的非特异性结合。

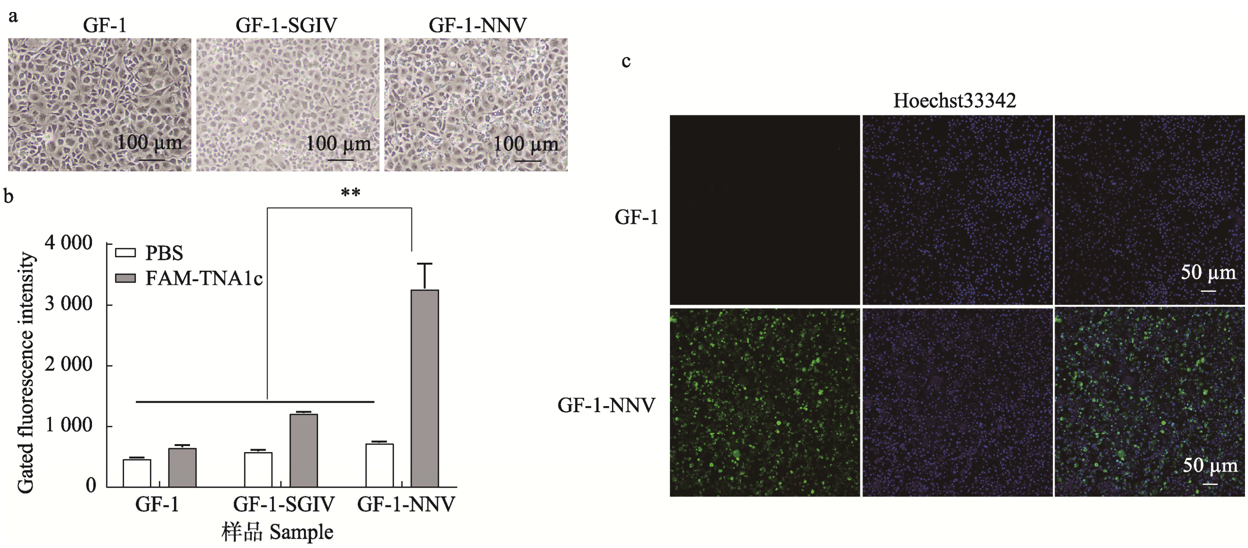

图 1　FAM 标记的核酸适配体 TNA1c (FAM-TNA1c)检测 NNV 感染细胞的特异性分析

Fig.1　The specificity of FAM-labeled aptamer detection for NNV infection

a：光学显微镜下细胞形态；b 和 c：流式细胞术和激光共聚焦技术分析 FAM-TNA1c 特异性识别结合 NNV 感染的靶细胞。**表示与其他组相比差异极显著(P<0.01)，下同。

a: Cell morphology was observed using optical microscopy. Flow cytometry (b) and confocal laser scanning microscopy (c) were applied to analyze the specific recognition and binding of aptamer FAM-TNA1c to NNV-infected target cells. ** represented extremely significant difference compared with other groups (P<0.01). The same below.

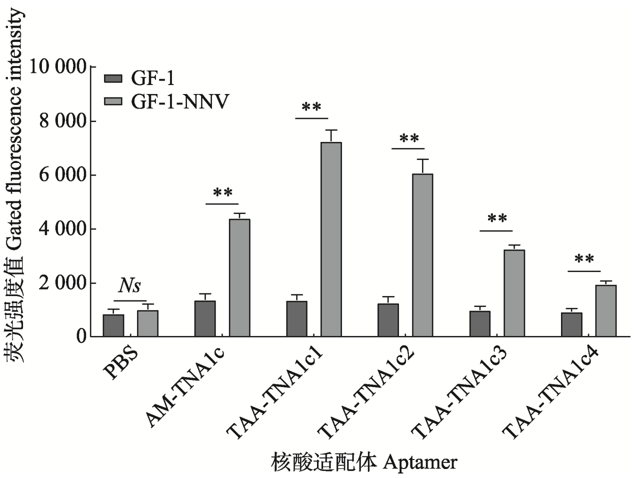

图 2　5 种核酸适配体特异性识别结合 NNV 感染细胞的分析

Fig.2　The optimal conformational method for detecting NNV infection using aptamer TNA1c-TAA

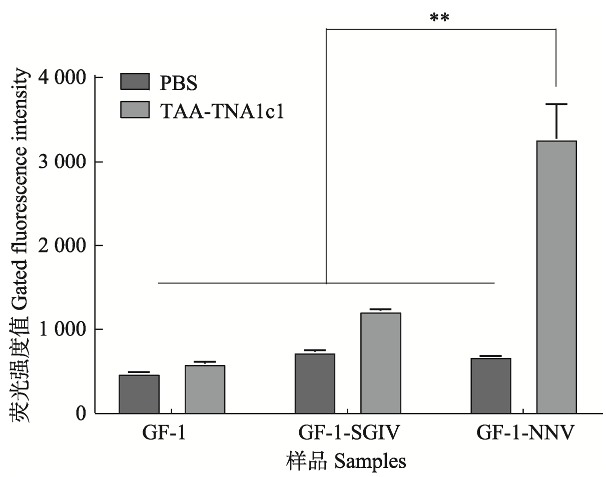

图 3　TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染的特异性分析

Fig.3　Specific analysis of aptamer TNA1c1-TAA for detecting NNV infection

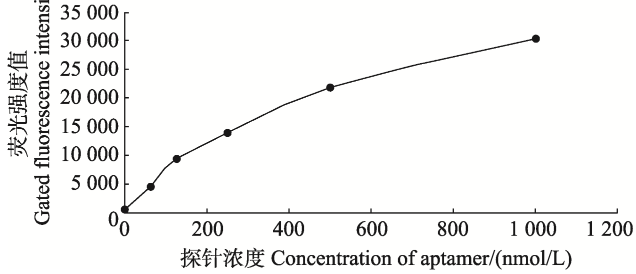

图 4　TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染的工作浓度分析

Fig.4　Analysis of working concentration for aptamer TNA1c1-TAA detecting NNV infection

因此，TNA1c-TAA 在 4~28 ℃的温度范围内，均能够高特异性地识别 NNV 感染。

2.8　TNA1c1-TAA 与 qPCR 在活体水平检测 NNV 感染的比较

探针 TNA1c1-TAA 与 qPCR 技术在活体水平检测 NNV 感染的比较分析结果如图 8 所示，分别使用本研究构建的 TNA1c1-TAA 与 qPCR 技术对 20 条患病石斑鱼脑组织进行检测，结果显示，TNA1c1-TAA

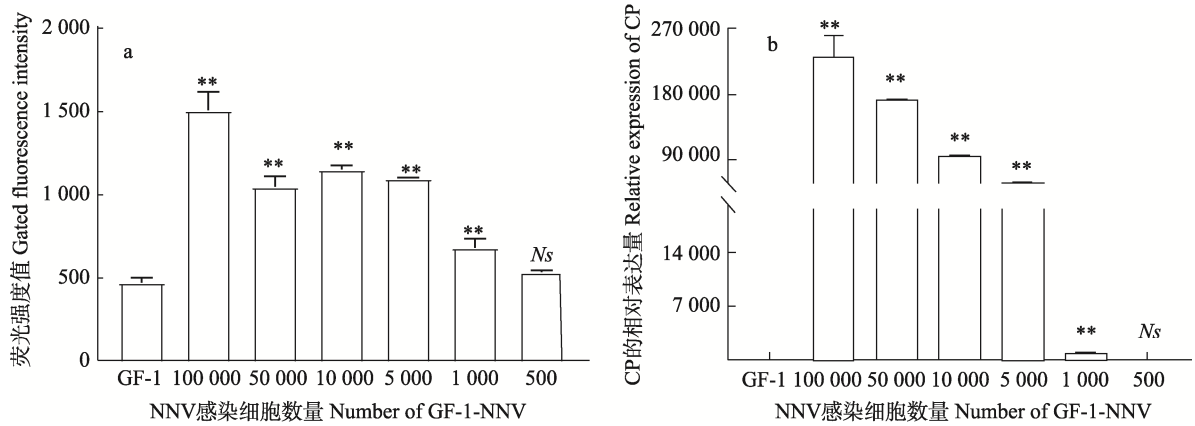

图 5　核酸适配体探针 TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染的数量敏感性分析

Fig.5　Quantitative sensitivity analysis of aptamer TNA1c1-TAA for NNV infection detection

a：流式细胞术分析核酸适配体 TNA1c1-TAA(500 nmol/L)特异性识别结合不同数目的 NNV 感染细胞；
b：qPCR 检测不同数目的 NNV 感染细胞

a: Flow cytometry analysis of the specific binding of aptamer TNA1c1-TAA (500 nmol/L) to varying numbers of NNV-infected cells. b: Detection of different quantities of NNV-infected cells using qPCR.

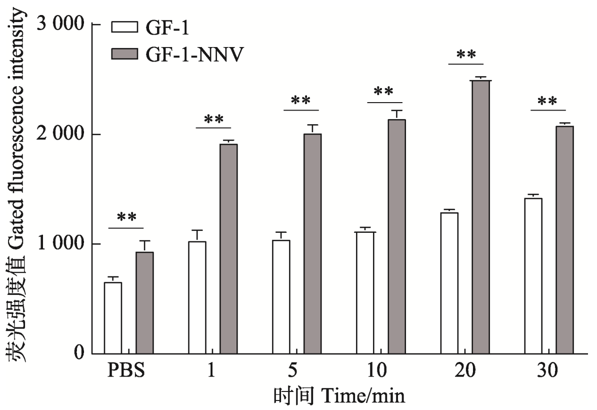

图 6　TNA1c1-TAA 检测 NNV 感染的时间敏感性分析

Fig.6　Analysis of time-sensitivity for aptamer probe TNA1c1-TAA in detecting NNV infection

TNA1c1-TAA (500 nmol/L)与 NNV 感染细胞分别孵育结合 30, 20, 10, 5, 1 min，使用流式细胞术进行检测分析。
TNA1c1-TAA (500 nmol/L) was incubated with NNV-infected cells for binding durations of 30, 20, 10, 5, 1 min, respectively. Subsequent detection and analysis were performed using flow cytometry.

可以特异性识别 NNV 感染的石斑鱼脑组织细胞，TNA1c1-TAA 检测样品的阳性率与 qPCR 检测结果一致，证实 TNA1c1-TAA 具有应用于石斑鱼养殖中 NNV 快速诊断的潜力。

3　讨论

核酸适配体作为一种新兴的核酸分子工具，近年来在精准医学、病原检测及抗病原感染等多领域实现了突破性进展(Yu *et al*, 2021)。在临床诊断方面，不仅可精准识别流感病毒、埃博拉病毒及新型冠状病毒等多种包膜病毒表面抗原，更能在复杂生物样本中实现痕量病原体的快速捕获。潘雅杰等(2024)利用特异性识别甲型 H1N1 流感病毒的核酸适配体，通过偶联纳米磁珠，无需对病毒核酸进行提取和富集，实现超低量灭活病毒的捕获，操作便捷且具有高生物安全性。田先敏等(2024)开发了基于核酸适配体构建 SERS 检测平台，利用手持拉曼光谱仪在 5 min 内快速诊断

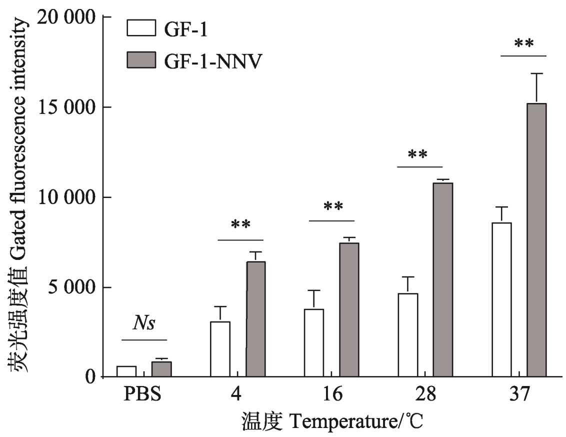

图 7　核酸适配体检测 NNV 感染的稳定性分析

Fig.7　Stability analysis of aptamer-based detection for NNV infection

TNA1c1-TAA (500 nmol/L)与 NNV 感染细胞分别在 37, 28, 16, 4 ℃下孵育结合，然后使用流式细胞术进行检测分析。
The aptamer probe TNA1c1-TAA (500 nmol/L) was incubated with NNV-infected cells at temperatures of 37, 28, 16, 4 ℃, respectively. Subsequent detection and analysis were performed using flow cytometry to evaluate binding stability under varying thermal conditions.

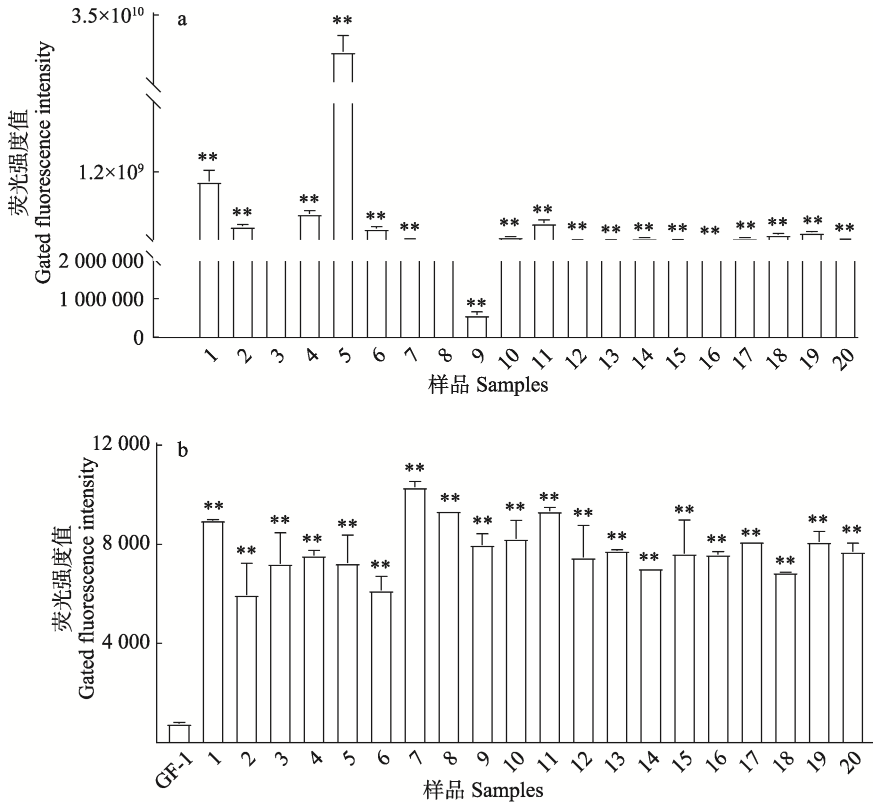

图 8　TNA1c1-TAA (a)与 qPCR (b)技术在活体水平检测 NNV 感染的比较分析

Fig.8　Comparative analysis of sensitivity between TNA1c1-TAA (a) and qPCR (b) for detecting NNV infection *in vivo*

SARS-CoV-2 模拟病毒。该方法利用核酸适配体与冠状病毒结合时表面空间位阻较小和高亲和力的优势，极大提高了灵敏度，证明了核酸适配体结合拉曼光谱技术在快速检测领域的优势，为后续研究奠定了基础。在水产病原检测方面，目前已筛选出能够特异性识别副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)外膜蛋白 OmpW 的 VP-Apt12 (李洁等, 2023)，白斑综合征病毒(WSSV)衣壳蛋白 VP28 的 WSSV-Apt9 (王诗怡等, 2016)，石斑鱼神经坏死病毒感染细胞的 TNA1 (Yu *et al*, 2019a)。本研究所使用的核酸适配体 TNA1c 是对 TNA1 进行结构优化、化学修饰所获得。目前报道的核酸适配体都具有特异性强、灵敏度高等特性，例如 UB-DNA 适配体(AptD3/AptD4)可特异性识别登革热病毒(Dengue virus) NS1 蛋白(Matsunaga *et al*, 2021)，核酸适配体 MHs 可以特异性识别马尔堡病毒(Marburg virus) GP 蛋白，结合位点独立于病毒颗粒的 5'端结构域，借此区分马尔堡病毒与埃博拉病毒(Tawiah *et al*, 2020)。本研究也对荧光修饰的 TNA1c (FAM-TNA1c)特异性进行了验证，证明可以有效区分识别石斑鱼常见的两种病毒性病原 SGIV 和 NNV，即 FAM-TNA1c 只特异性识别 NNV 感染的细胞。

靶标激活式核酸适配体(TAA)作为一种改进型分子探针，在没有靶标物质存在的情况下，TAA 探针不发出荧光信号或者发出的荧光信号较弱。然而，当 TAA 探针与靶标物质结合后，增加了荧光基团与猝灭基团之间的距离，导致其相互作用减弱，最终使荧光基团被激活而发出强烈的荧光信号(Lai *et al*, 2017)。通过监测荧光信号的强弱，实现对靶标物质的高灵敏度、高特异性检测。TAA 探针的荧光基团仅在靶标分子存在时被激活并产生信号的特性，有效降低了背景荧光值，提高了检测的灵敏度。Shi 等(2011)设计靶标激活式核酸适配体探针 sgc8，用于活体内肿瘤细胞检测，检测下限低至 118 个细胞，检测时间短至 15 min，而且基于核酸适配体无细胞毒性及免疫原性的优良性能，适用于活体成像。Zhao 等(2011)设计 PDGF 特异性响应探针，实现高时空分辨定量检测，为活体细胞生物学研究提供新思路。除此之外，亦有报道称靶标激活式核酸适配体探针 C10 可特异性识别凝血酶(Pavlov *et al*, 2005)，FAM/GO-nS 可特异性识别小鼠上皮细胞(Wang *et al*, 2010)。本研究通过对特异性识别石斑鱼神经坏死病毒的核酸适配体 TNA1 进行结构优化、化学修饰，获得 4 种靶标激活式核酸适配体探针(TNA1c1-TAA、TNA1c2-TAA、TNA1c3-TAA、TNA1c4-TAA)，4 种探针均可

特异性识别结合 NNV 感染细胞，其中 TNA1c1-TAA 探针结合靶细胞的能力最强，说明 TNA1c1-TAA 具有用于开发针对 NNV 的即时检测技术的潜力。与 TNA1c1-TAA 相比，其他 3 种探针 TNA1c2-TAA、TNA1c3-TAA、TNA1c4-TAA 与靶细胞结合后发出的荧光低于 TNA1c1-TAA，其可能原因是从 TNA1c1-TAA 到 TNA1c4-TAA 其 C 链的结合强度是逐渐增加的，导致探针在结合靶点后互补序列难以打开，所以荧光值出现了逐渐下降的趋势。

检测技术开发需要着重关注检测准确性、检测成本、检测时间以及操作的简便性等方面。本研究所开发的靶标激活式核酸适配体能够有效降低背景值，提高了检测的特异性和准确性。此外，检测试剂的使用量是检测成本最主要的关注因素之一，核酸适配体 OTA 检测赭曲霉毒素 A 的最适工作浓度 1 μmol/L (Mukherjee *et al*, 2021)；核酸适配体 VA2- ELASA 检测溶藻弧菌的最适工作浓度为 200 nmol/L (Yu *et al*, 2019c)。本研究中的 TNA1c1-TAA 的最适合工作浓度为 500 nmol/L，和前人结果存在差别，这可能与检测对象的大小不同(化学小分子与细胞)、探针本身和靶标结合力的强弱相关。

RT-PCR 是目前病原检测最为常用的技术，具有特异性强、灵敏度高的优点。但 RT-PCR 技术的整个操作流程包括样品核酸提取、反转录以及 qPCR 三步，不仅操作繁琐、需要专业的技术人员，而且单个样品的检测时间长达 5~6 h，检测样品较多时，所耗费的时间会成倍增加。而本研究基于靶标激活式核酸适配体(TAA)的病原检测技术，不需要提取样品核酸，通过简单的探针–样品孵育，即可分析出病原感染情况，整个检测流程能在 30 min 内完成。而且检测温度无特殊要求，室温下亦可精确检测出病原感染，不需要昂贵的检测设备、操作步骤简单，同时适合于大批量样品的高通量快速检测。在检测灵敏度方面，RT-PCR 的灵敏度可达到 10^2拷贝/μL (胡加谊等, 2014)。而 TNA1c1-TAA 技术在病毒感染细胞数量低至 1×10^3个时，即可检测出 NNV 感染。尽管 TNA1c1-TAA 技术的灵敏度相较于 RT-PCR 略逊一筹，但在实际养殖场景中，针对一线养殖户所饲养的发病鱼类体内携带的病毒量而言，TNA1c1-TAA 技术的灵敏度足以实现有效识别。因此，可以证实 TNA1c1-TAA 技术具备应用于石斑鱼养殖中 NNV 快速诊断的潜力。

综上所述，本研究基于核酸适配体成功开发了一种靶标激活式分子探针 TNA1c1-TAA 用于检测 NNV 感染，该探针具有高度的特异性、优异的灵敏性以及操作快速简便等优点，可用于石斑鱼养殖中 NNV 的早期快速诊断。未来研究中，靶标激活式核酸适配体可以通过与纳米材料、微流控芯片等技术结合，构建水产病害新型即时检测平台，实现大批量样品的高通量快速检测和养殖水体病原的实时监测，为构建水产疫病"预防-诊断-控制"三位一体防控体系奠定基础。

参 考 文 献

胡加谊, 罗志文, 范鸿雁, 等. 菠萝凋萎相关病毒-2 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立. 园艺学报, 2014, 41(6): 1257–1266 [HU J Y, LUO Z W, FAN H Y, *et al*. Development of a real-time fluorescent quantitative RT-PCR method for the detection of pineapple mealybug wilt associated virus-2. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(6): 1257–1266]

江天久, 江涛, 曾淼, 等. 湛江棕囊藻对南美白对虾虾苗和多种鱼苗的毒性研究. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(6): 487–491 [JIANG T J, JIANG T, ZENG M, *et al*. Toxicity of red tide alga *Phaeoecystis globosa* scherffel from Zhanjiang against young *Penaeus vannamei* Boone and fish fry. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2006, 14(6): 487–491]

李洁, 岳晓禹, 崔丽伟, 等. 副溶血性弧菌特异性核酸适配体筛选. 生物技术进展, 2023, 13(4): 612–618 [LI J, YUE X Y, CUI L W, *et al*. SELEX of *Vibrio parahaemolyticus* specific aptamer. Current Biotechnology, 2023, 13(4): 612–618]

李鹏飞, 张帅帅, 刘明珠, 等. 核酸适体的筛选及其在养殖动物病原检测中的应用进展. 水产学报, 2024, 48(8): 14–28 [LI P F, ZHANG S S, LIU M Z, *et al*. Screening of aptamers and their application progress in the detection of pathogenic microorganisms in cultured animals. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(8): 14–28]

刘慧敏, 郝聚敏, 许净, 等. 哈维氏弧菌与溶藻弧菌共有核酸适配体的筛选及鉴定. 分析化学, 2020, 48(5): 623–631 LIU H M, HAO J M, XU J, *et al*. Selection and identification of common aptamers against both *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus*. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2020, 48(5): 623–631

潘雅杰, 张巧巧, 王峥, 等. 高效化学偶联的 H1N1 灭活病毒核酸适配体比色传感器. 首都师范大学学报(自然科学版), 2024, 45(3): 87–96 [PAN Y J, ZHANG Q Q, WANG Z, *et al*. Colorimetric aptasensor for the detection of H1N1 inactivated virus-based on highly efficient chemical crosslinking. Journal of Capital Normal University (Natural Science), 2024, 45(3): 87–96]

彭智发. 荧光定量 PCR 法检测点带石斑鱼神经坏死病毒研究. 福建畜牧兽医, 2015, 37(1): 15–18 [PENG Z F. Research of real-time quantitative RT-PCR detected *Epinephelus lanceolatus* grouper nervous necrosis virus. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2015, 37(1):

15–18]
沈海洋, 卢志杰, 秦真东, 等. 谷氨酰胺对斜带石斑鱼 GF-1 细胞中 C-Myc 蛋白的表达与神经坏死病毒复制的影响. 水产学报, 2020, 44(9): 1385–1396 [SHEN H Y, LU Z J, QIN Z D, *et al*. Relationship between the expression of C-Myc protein and the replication of nervous necrosis virus in GF-1 cells treated with Glutamine. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(9): 1385–1396]
田先敏, 许珊珊, 关鹏程, 等. 基于双核酸适配体的磁珠-SERS 标签三明治结构用于 SARS-CoV-2 病毒表面 S 蛋白的快速检测. 分析科学学报, 2024, 40(1): 1–7 [TIAN X M, XU S S, GUAN P C, *et al*. Double aptamer-based magnetic bead-SERS-tagged sandwich structure for rapid detection of SARS-CoV-2 virus S protein. Journal of Analytical Science, 2024, 40(1): 1–7]
汪琼, 刘飞, 柳传祺, 等. CRISPR/Cas 应用于核酸特异性检测及其在检测 SARS-Cov-2 病毒中的应用. 安徽医科大学学报, 2023, 58(12): 2139–2145 [WANG Q, LIU F, LIU C Q, *et al*. CRISPR/Cas applied to nucleic acid specific detection and its application in detecting SARS-CoV-2 virus. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2023, 58(12): 2139–2145]
王诗怡, 夏晨阳, 怀浩, 等. VP28-CecropinD 融合蛋白抗对虾白斑综合征病毒效果的研究. 科技展望, 2016, 26(36): 69, 166 [WANG S Y, XIA C Y, HUAI H, *et al*. Study on the anti-white spot syndrome virus effect of VP28-CecropinD fusion protein. Science and Technology, 2016, 26(36): 69, 166]
许海东, 区又君, 郭志勋, 等. 神经坏死病毒对卵形鲳鲹的致病性及外壳蛋白基因序列分析. 上海海洋大学学报, 2010, 19(4): 482–488 [XU H D, OU Y J, GUO Z X, *et al*. The pathogenicity of nervous necrosis virus to *Trachinotus ovatus* and sequence analysis of the coat protein gene. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(4): 482–488]
余庆, 刘明珠, 李梦梦, 等. 特异性识别草鱼呼肠孤病毒感染细胞的 ssDNA 核酸适配体筛选与鉴定. 南方农业学报, 2020, 51(12): 3057–3065 [YU Q, LIU M Z, LI M M, *et al*. Selection and characterization of ssDNA aptamer specifically recognizing grass carp reovirus (GCRV) infected fish cells. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(12): 3057–3065]
余庆, 刘明珠, 吴思婷, 等. 致病性溶藻弧菌的 ssDNA 核酸适配体的筛选与应用. 2018 年中国水产学会学术年会论文摘要集, 2018, 52 [YU Q, LIU M Z, WU S T, *et al*. Selection and application of ssDNA aptamers for pathogenic *Vibrio alginolyticus*. China Society of Fisheries. Abstract Collection of Papers of china society of fisheries Academic Annual Conference in 2018, 2018, 52]
张梦兰, 秦真东, 卢志杰, 等. 斜带石斑鱼甘露糖受体基因的克隆表达及其功能. 水产学报, 2021, 45(8): 1279–1295 [ZHANG M L, QIN Z D, LU Z J, *et al*. Molecular cloning and functional study of mannose receptor gene in *Epinephelus coioides*. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(8): 1279–1295]
张帅帅, 刘明珠, 黄静, 等. 基于核酸适体的高通量模型筛选抗大口黑鲈虹彩病毒药物. 广东海洋大学学报, 2024, 44(3): 9–16 [ZHANG S S, LIU M Z, HUANG J, *et al*. Aptamer-based high-throughput screening model for efficient selection and evaluation of medicines against largemouth bass virus infection. Journal of Guangdong Ocean University, 2024, 44(3): 9–16]
周伶俐, 李鹏飞, 秦启伟. 水生生物病原核酸适配体研究进展. 广西科学, 2018, 25(1): 26–31, 35 [ZHOU L L, LI P F, QIN Q W. Advances in study of aptamers in pathogens of aquatic organisms. Guangxi Sciences, 2018, 25(1): 26–31, 35]
朱春华, 刘荭, 刘晓东, 等. 中华鳖虹彩病毒单克隆抗体的制备及其抗原表位的初步分析. 水产学报, 2009, 33(5): 840–846 [ZHU C H, LIU H, LIU X D, *et al*. Preparation and epitope analysis of monoclonal antibodies against soft-shelled turtle iridovirus (STIV). Journal of Fisheries of China, 2009, 33(5): 840–846]
CHINCHAR V G, HYATT A, MIYAZAKI T, *et al*. Family Iridoviridae: Poor viral relations no longer. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2009, 328: 123–170
HOU Z W, DING Z Y, ZHANG Y, *et al*. Establishment and application of a rapid detection method of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in aquacultural waters by using a novel one-pot RAA-CRISPR/Cas12a combined with Fe-iron flocculation technology. Journal of Fish Diseases, 2025, 48(5): e14089
HUANG, TAN, CHANG, *et al*. Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. Journal of Fish Diseases, 2001, 24(3): 135–141
HÚSGAĞ S, GROTMOL S, HJELTNES B K, *et al*. Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. Diseases of Aquatic Organisms, 2001, 45(1): 33–44
LAI Z Q, TAN J T, WAN R R, *et al*. An ‘activatable’ aptamer-based fluorescence probe for the detection of HepG2 cells. Oncology Reports, 2017, 37(5): 2688–2694
LI C, LIU J X, ZHANG X, *et al*. Red grouper nervous necrosis virus (RGNNV) induces autophagy to promote viral replication. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 908–916
LI P F, YAN Y, WEI S N, *et al*. Isolation and characterization of a new class of DNA aptamers specific binding to Singapore grouper iridovirus (SGIV) with antiviral activities. Virus Research, 2014, 188: 146–154
LIU L, ZHANG Y, YUAN M D, *et al*. Integrated multi-omics

analysis reveals liver metabolic reprogramming by fish iridovirus and antiviral function of alpha-linolenic acid. Zoological Research, 2024b, 45(3): 520–534

LIU X, LI B K, LIU Q X, *et al*. *In vivo* and *in vitro* antiviral effect and mechanisms of Rhein against nervous necrosis virus. Aquaculture, 2024a, 579: 740207

MATSUNAGA K I, KIMOTO M, LIM V W, *et al*. High-affinity five/six-letter DNA aptamers with superior specificity enabling the detection of dengue NS1 protein variants beyond the serotype identification. Nucleic Acids Research, 2021, 49(20): 11407–11424

MUKHERJEE M, NANDHINI C, BHATT P. Colorimetric and chemiluminescence based enzyme linked apta-sorbent assay (ELASA) for ochratoxin A detection. Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2021, 244: 118875

MUNDAY B L, KWANG J, MOODY N. Betanodavirus infections of teleost fish: A review. Journal of Fish Diseases, 2002, 25(3): 127–142

NISHIZAWA T, KOKAWA Y, WAKAYAMA T, *et al*. Enhanced propagation of fish nodaviruses in BF-2 cells persistently infected with snakehead retrovirus (SnRV). Diseases of Aquatic Organisms, 2008, 79(1): 19–25

PAVLOV V, SHLYAHOVSKY B, WILLNER I. Fluorescence detection of DNA by the catalytic activation of an aptamer/thrombin complex. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(18): 6522–6523

QIN Q W, GIN K Y, LEE L Y, *et al*. Development of a flow cytometry based method for rapid and sensitive detection of a novel marine fish iridovirus in cell culture. Journal of Virological Methods, 2005, 125(1): 49–54

SHI C Y, WEI Q, GIN K Y H, *et al*. Production and characterization of monoclonal antibodies to a grouper iridovirus. Journal of Virological Methods, 2003, 107(2): 147–154

SHI H, HE X X, WANG K M, *et al*. Activatable aptamer probe for contrast-enhanced *in vivo* cancer imaging based on cell membrane protein-triggered conformation alteration. PNAS, 2011, 108(10): 3900–3905

SONG Y, ZHANG Y, XIAO S M, *et al*. Akt inhibitors prevent CyHV-2 infection *in vitro*. Fish & Shellfish Immunology, 2024, 154: 109940

Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. Biomolecular Engineering, 2007, 24(4): 381–403

TAWIAH K D. Aptamers that bind filovirus GP: A new frontier for detection and neutralization of Ebola and Marburg virus. University of Missouri Libraries, Ph.D., 2020, DOI: 10.32469/10355/86511

WANG Y, LI Z H, HU D H, *et al*. Aptamer/graphene oxide nano complex for *in situ* molecular probing in living cells. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(27): 9274–9276

XIAO H H, LIU M Z, LI S Q, *et al*. Isolation and characterization of a ranavirus associated with disease outbreaks in cultured hybrid grouper (♀ tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ giant grouper *E. lanceolatus*) in Guangxi, China. Journal of Aquatic Animal Health, 2019, 31(4): 364–370

YU Q, LIU M Z, WEI S N, *et al*. Characterization of ssDNA aptamers specifically directed against *Trachinotus ovatus* NNV (GTONNV)-infected cells with antiviral activities. The Journal of General Virology, 2019a, 100(3): 380–391

YU Q, LIU M Z, WEI S N, *et al*. Isolation of nervous necrosis virus from hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂) cultured in Guangxi, China. Fish Pathology, 2019b, 54(1): 16–19

YU Q, LIU M Z, WEI S N, *et al*. Research progress and prospects for the use of aptamers in aquaculture biosecurity. Aquaculture, 2021, 534: 736257

YU Q, LIU M Z, WU S T, *et al*. Generation and characterization of aptamers against grass carp reovirus infection for the development of rapid detection assay. Journal of Fish Diseases, 2020, 44(1), 33–44

YU Q, LIU M Z, XIAO H H, *et al*. Development of novel aptamer-based enzyme-linked apta-sorbent assay (ELASA) for rapid detection of mariculture pathogen *Vibrio alginolyticus*. Journal of Fish Diseases, 2019c, 42(11): 1523–1529

ZHANG X Y, WANG L Q, LIU J X, *et al*. Generation and identification of novel DNA aptamers with antiviral activities against largemouth bass virus (LMBV). Aquaculture, 2022, 547: 737478

ZHAO W A, SCHAFER S, CHOI J, *et al*. Cell-surface sensors for real-time probing of cellular environments. Nature Nanotechnology, 2011, 6(8): 524–531

ZHOU L L, LI P F, YANG M, *et al*. Generation and characterization of novel DNA aptamers against coat protein of grouper nervous necrosis virus (GNNV) with antiviral activities and delivery potential in grouper cells. Antiviral Research, 2016, 129: 104–114

ZHOU L, LI P, NI S, *et al*. Rapid and sensitive detection of red spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) infection by aptamer-coat protein-aptamer sandwich enzyme-linked apta-sorbent assay (ELASA). Journal of Fish Diseases, 2017, 40(12): 1831–1838

(编辑　马璀艳)

Construction of a Target-Activatable Aptamer TNA1c for Specific Detection of Grouper Nervous Necrosis Virus Infection

LI Miao[1,2], XU Youhou[1], XIE Jinkun[2], LIU Mingzhu[2], HUANG Jing[2], CHANG Yanlei[3], XU Weijiang[4], HUANG Lin[2], HAN Shuyu[5], YU Qing[2①], LI Pengfei[1,2]

(1. *Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, College of Marine Sciences, Beibu Gulf University, Qinzhou* 535011, *China*;
2. *Guangxi Academy of Sciences, Guangxi Academy of Marine Sciences, Guangxi Key Laboratory of Aquatic Biotechnology and Modern Ecological Aquaculture, Guangxi Engineering Research Center for Fishery Major Diseases Control and Efficient Healthy Breeding Industrial Technology* (*GERCFT*), *Nanning* 530007, *China*;
3. *Guangdong Double Helix Gene Technology Co., Ltd, Guangzhou* 511453, *China*;
4. *Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Disease Control and Healthy Culture, College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang* 524088, *China*;
5. *Guangxi Fisheries Technology Extension Station, Nanning* 530199, *China*)

Abstract Nervous necrosis virus (NNV), a devastating viral pathogen in grouper aquaculture, severely impacts the grouper farming industry. NNV-induced viral nervous necrosis triggers mass mortality in larvae and juveniles. The need to develop novel detection technologies with on-site rapid response capability, operational simplicity, and high sensitivity/specificity to meet the demands for early diagnosis and precise prevention is urgent. In this study, we constructed a target-activated aptamer probe (TNA1c-TAA) through structural modification and chemical engineering of TNA1, an aptamer that specifically recognizes NNV-infected cells. Flow cytometry, confocal microscopy, and real-time quantitative PCR (qPCR) revealed that TNA1c-TAA exhibited high specificity for NNV-infected cells without cross-reactivity to other virus-infected cells. The TNA1c-TAA probe (500 nmol/L) precisely detected 1×10^3 NNV-infected cells within 1 min at 4–28 ℃. *In vivo* detection demonstrated specific recognition of NNV-infected brain tissue cells in grouper, with 100% agreement between the TNA1c-TAA positivity rate and qPCR results. These findings highlight the potential of the TNA1c-TAA for the rapid diagnosis of NNV in aquaculture, laying the foundation for establishing a trinity prevention-diagnosis-control system against aquatic epidemics.

Key words Grouper; Nervous necrosis virus; Rapid detection assay; Aptamer; Target-activatable probe

① Corresponding author: YU Qing, Email: yuqing@gxas.cn