



中华人民共和国国家标准

GB/T 40249—2021

斑节对虾杆状病毒病诊断规程 PCR 检测法

Code of diagnosis for infection with *Penaeus monodon*-type baculovirus—
PCR method

2021-05-21 发布

2021-12-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会(SAC/TC 156)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院黄海水产研究所、全国水产技术推广总站。

本文件主要起草人：杨冰、万晓媛、黄健、李清、史成银、张锋、宋晓玲、余卫忠、张庆利、李晨、刘莉、许华。

斑节对虾杆状病毒病诊断规程

PCR 检测法

1 范围

本文件规定了斑节对虾杆状病毒病诊断规程中普遍适用的核酸检测技术的要求,针对斑节对虾杆状病毒(*Penaeus monodon*-type baculovirus, MBV),给出了 PCR 检测法所需试剂或材料、仪器设备、样品、试验步骤和结果判定。

本文件适用于对虾各生活期样品中 MBV 带毒情况的定性检测,以进行斑节对虾杆状病毒病的流行病学调查、诊断、检疫和监测。

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 28630.4—2012 白斑综合征(WSD)诊断规程 第4部分:组织病理学诊断法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp:碱基对(base pair)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

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

EB:溴化乙啶(ethidium bromide)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)

HCl:盐酸(hydrogen chloride)

MBV:斑节对虾杆状病毒(*Penaeus monodon*-type baculovirus)

NaOH:氢氧化钠(sodium hydroxide)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

SDS:十二烷基硫酸(sodium dodecyl sulfate)

Taq:水生栖热菌(thermus aquaticus)

TE:Tris 盐酸和 EDTA 缓冲液(EDTA Tris · HCl)

Tris:三羟甲基氨基甲烷(tris hydroxymethyl aminomethane)

5 试剂或材料

- 5.1 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。
- 5.2 无水乙醇。
- 5.3 TE 缓冲液:按附录 A 中 A.3 配制。
- 5.4 抽提缓冲液:按 A.6 配制。
- 5.5 蛋白酶 K:按 A.7 配制。
- 5.6 10 mol/L 乙酸铵:按 A.8 配制。
- 5.7 Tirs 饱和酚($\text{pH} \geq 7.8$)。
- 5.8 酚/氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1)。
- 5.9 氯仿/异戊醇(24 : 1)。
- 5.10 1×电泳缓冲液:按 A.10 配制。
- 5.11 70%乙醇:按 A.11 配制。
- 5.12 dNTPs(各 2.5 mmol/L):生化试剂,含 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 各 2.5 mmol/L 的混合物,−20 °C 保存,用于 PCR。
- 5.13 10×PCR 缓冲液:生化试剂,无 Mg^{2+} 离子,−20 °C 保存。
- 5.14 MgCl_2 (25 mmol/L):生化试剂,−20 °C 保存。
- 5.15 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL):生化试剂,−20 °C 保存。
- 5.16 引物 261F(10 mol/L):5'-AAT-CCT-AGG-CGA-TCT-TAC-CA-3',−20 °C 保存。
- 5.17 引物 261R(10 $\mu\text{mol/L}$):5'-CGT-TCG-TTG-ATG-AAC-ATC-TC-3',−20 °C 保存。
- 5.18 内参引物 CF(10 $\mu\text{mol/L}$):5'-TGC-CTT-ATC-AGC-TNT-CGA-TTG-TAG-3',−20 °C 保存。
- 5.19 内参引物 CR(10 $\mu\text{mol/L}$):5'-TTC-AGN-TTT-GCA-ACC-ATA-CTT-CCC-3',−20 °C 保存。
- 5.20 PCR 检测阳性对照:为已知受 MBV 感染且 PCR 结果显示阳性的对虾组织样品,−80 °C 保存。
- 5.21 PCR 检测阴性对照:为已知未受 MBV 感染且 PCR 结果显示阴性的对虾组织样品,−80 °C 保存。
- 5.22 PCR 检测空白对照:灭菌双蒸水。
- 5.23 琼脂糖:生化试剂。
- 5.24 DNA 分子量标准:生化试剂。
- 5.25 6×载样缓冲液:生化试剂。
- 5.26 10 mg/mL EB 贮存液:按 A.12 配制,或其他等效产品。

6 仪器设备

- 6.1 PCR 仪。
- 6.2 电泳仪。
- 6.3 水平电泳槽。
- 6.4 紫外观察仪或凝胶成像仪。
- 6.5 高速离心机。
- 6.6 水浴锅或金属浴。
- 6.7 普通冰箱。
- 6.8 −80 °C 超低温冰箱。
- 6.9 电炉或微波炉等其他加热设备。
- 6.10 微量移液器:量程 0.5 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL 。

7 样品

7.1 采样对象

斑节对虾(*Penaeus monodon*)等易感对虾。参见附录 B。

7.2 采样数量、方法和保存运输

采样数量、方法和保存运输应符合 GB/T 28630.4—2012 中附录 B 的要求。

7.3 样品的采集

7.3.1 对虾仔虾取完整个体;幼虾、成虾和亲虾取肝胰腺和肠道;亲虾的非致死性取样可采集粪便。

7.3.2 分子生物学检测时,仔虾或未达到 0.5 g 样品可以合并样本,个体稍大的虾可取个体进行检测。所取样品分别置于 1.5 mL 离心管中,立即进行 DNA 提取操作或暂时保存于 -20°C 。

8 试验步骤

8.1 DNA 的提取

8.1.1 取 30 mg~50 mg 组织样品,加入抽提缓冲液 500 μL ,充分研磨, 37°C 温浴 1 h。提取过程同时设置阳性对照和阴性对照。

8.1.2 加入 2.5 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K,至终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,混匀后置于 50°C 水浴 3 h,不时旋动。

8.1.3 将溶液冷却至室温,加入等体积平衡酚,颠倒混合 10 min,于 10 000 r/min 离心 3 min 分离两相。

8.1.4 水相移至新 1.5 mL 离心管中,加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1),颠倒混合 10 min,于 10 000 r/min 离心 1 min 分离两相。

8.1.5 水相移至一新 1.5 mL 离心管中,加入等体积氯仿/异戊醇(24 : 1),颠倒混合 10 min,于 10 000 r/min 离心 1 min 分离两相。

8.1.6 水相移至一新 1.5 mL 离心管中,加入 100 μL 10 mol/L 乙酸铵,混匀后,再加入两倍体积预冷无水乙醇(-20°C)混匀, -20°C 放置 2 h。10 000 r/min 离心 10 min,弃上清。

8.1.7 用 70%乙醇洗涤沉淀 2 次,每次 10 000 r/min 离心 5 min,小心弃掉上清,将沉淀于室温晾干。

8.1.8 加入 100 μL 灭菌双蒸水溶解 DNA。

8.1.9 若 DNA 样品需要保存,可溶解于 100 μL TE 缓冲液中并保存于 -20°C 。

8.1.10 可采用同等抽提效果的其他方法或使用商品化 DNA 提取试剂盒。

8.2 PCR 扩增

8.2.1 PCR 反应体系:按照表 1 的要求,加入除 Taq DNA 聚合酶以外的各项试剂,配制成大体积的预混物,分装保存于 -20°C 。临用前,加入相应体积的 Taq DNA 聚合酶,混匀,按 1 个反应体系/支分装到 0.2 mL PCR 管中。分别加入各样品的模板 DNA(质量浓度:50 ng/ μL ~100 ng/ μL)1 μL ,同时设阳性对照、阴性对照和空白对照。

8.2.2 将上述加有 DNA 模板的 PCR 管按以下程序进行扩增: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s、 60°C 退火 30 s、 72°C 延伸 30 s,35 个循环; 72°C 延伸 7 min; 4°C 保温。

表1 MBV PCR 反应预混物所需试剂·组成

试剂	25 μL 体系	试剂终浓度
10 \times PCR 缓冲液(无 Mg^{2+})	2.5 μL	1 \times PCR 缓冲液
试剂	25 μL 体系	试剂终浓度
MgCl_2 (25 mmol/L)	1.5 μL	1.5 mmol/L
dNTPs(各 2.5 mmol/L)	2.0 μL	200 $\mu\text{mol/L}$
引物 261F(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.75 μL	0.3 $\mu\text{mol/L}$
引物 261R(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.75 μL	0.3 $\mu\text{mol/L}$
灭菌双蒸水	16.4 μL	—
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.1 μL	0.02 U/ μL
注：25 μL 体系的模板量为 1 μL 。		

8.2.3 每份样品均设立十足目生物内参对照,扩增十足目生物组织 DNA 的 PCR 反应体系按照表 2 的要求。分别加入各样品的模板 DNA(质量浓度:50 ng/ μL ~100 ng/ μL)1 μL 。

表2 扩增十足目生物组织 DNA PCR 反应体系试剂·组成

试剂	25 μL 体系	试剂终浓度
10 \times PCR 缓冲液(无 Mg^{2+})	2.5 μL	1 \times PCR 缓冲液
MgCl_2 (25 mmol/L)	1.5 μL	1.5 mmol/L
dNTPs(各 2.5 mmol/L)	2.0 μL	200 $\mu\text{mol/L}$
内参引物 CF(10 $\mu\text{mol/L}$)	2.5 μL	1 $\mu\text{mol/L}$
内参引物 CR(10 $\mu\text{mol/L}$)	2.5 μL	1 $\mu\text{mol/L}$
灭菌双蒸水	12.9 μL	—
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.1 μL	0.02 U/ μL
注：25 μL 体系的模板量为 1 μL 。		

8.2.4 将上述加有 DNA 模板的 PCR 管按以下程序进行扩增:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

8.3 琼脂糖凝胶电泳及测序

8.3.1 配制 1.5% 的琼脂糖凝胶,加入 10 mg/mL EB 至终浓度 0.5 $\mu\text{g/mL}$,摇匀。制备琼脂糖凝胶。

8.3.2 将 5 μL PCR 反应产物与 1 μL 6 \times 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。

8.3.3 在 1 V/cm~5 V/cm 的电压下电泳,使 DNA 由负极向正极移动。当载样缓冲液中的溴酚蓝指示剂的色带迁移至琼脂糖凝胶的 1/2~2/3 处时停止电泳,将凝胶置于紫外观察仪或凝胶成像仪下观察或拍照。

8.3.4 如果观察到预期大小条带,对 PCR 扩增产物进行测序。

9 结果判定

9.1 检测结果成立条件

十足目生物组织样品在 848 bp 处有特定条带,阳性对照在 261 bp 处有特定条带,阴性对照在 261 bp 处无条带且空白对照不出现任何条带,试验有效。

9.2 检测结果判定

检测样品在 261 bp 处有条带,测序结果同参考序列(参见附录 C)进行比对,结果符合的可判为 PCR 结果阳性;检测样品在 261 bp 处无条带可判为 PCR 结果阴性。



附 录 A

(规范性)

试 剂 配 方

A.1 1 mol/L Tris · HCl(pH8.0)

Tris	121.1 g
水	800 mL
溶解后加入约 42 mL 浓盐酸调 pH 接近 8.0,冷却至室温,再用 2.5 mol/L HCl 调整 pH 至 8.0。	
加水定容至	1 000 mL
分装后,高压蒸气灭菌,室温贮存。	

A.2 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)

乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	18.6 g
水	80 mL
磁力搅拌,用 2.5 mol/L NaOH 调节溶液 pH 值至 8.0,完全溶解,定容至 100 mL。	
高压蒸气灭菌,室温贮存。	

A.3 TE 缓冲液(pH8.0)

1 mol/L Tris · HCl(pH8.0)	10 mL
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	2 mL
加水定容至	1 000 mL
高压蒸气灭菌,4 °C 贮存。	

**A.4 1 mg/mL 胰 RNA 酶**

胰 RNA 酶	10 mg
TE 缓冲液(pH8.0)	10 mL
溶解后,于 100 °C 加热 15 min,缓慢冷却至室温,分装 100 μL /管,−20 °C 贮存。	

A.5 10% SDS

SDS	10 g
水	90 mL
加热至 68 °C 助溶,加入几滴浓盐酸调节溶液的 pH 值至 7.2,加水定容至 100 mL。	
室温贮存。若溶液有结晶形成,用前加热融解即可。	

SDS 微细晶粒易于扩散,称量时要戴面罩,称量完毕后要清除残留在称量工作台区和天平上的 SDS。

A.6 抽提缓冲液

1 mol/L Tris · HCl(pH8.0)	1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	20 mL
1 mg/mL 胰 RNA 酶	2 mL
10% SDS	5 mL

加水定容至 100 mL
混匀,室温贮存。

A.7 20 mg/mL 蛋白酶 K

蛋白酶 K 20 mg
水 1 mL
溶解后分装于 1.5 mL 离心管中(0.25 mL/管), -20 °C 下保存。

A.8 10 mol/L 乙酸铵

乙酸铵 77 g
水 30 mL
加水定容至 100 mL,经 0.45 μm 滤膜过滤除菌,4 °C 贮存。

A.9 50×电泳缓冲液

Tris 242 g
冰乙酸 57.1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH8.0) 100 mL
加水定容至 1 000 mL
室温贮存。

A.10 1×电泳缓冲液

50×电泳缓冲液 20 mL
加水定容至 1 000 mL
室温贮存。

A.11 70%乙醇

无水乙醇 70 mL
加水 30 mL,混匀,定容至 100 mL
分装后,室温贮存。

A.12 10 mg/mL EB 贮存液

EB 10 mg
水 1 mL
磁力搅拌数小时以确保其完全溶解。室温保存于棕色瓶或用铝铂包裹的瓶中。

附 录 B

(资料性)

斑节对虾杆状病毒病简介

斑节对虾杆状病毒病(Infection with *Penaeus monodon*-type baculovirus)由斑节对虾杆状病毒(MBV)感染引起。国际病毒分类委员会(ICTV)将该病毒名称暂定为斑节对虾单核多角体病毒(Pe-moNPV),但在多数情况下该病原被称为 MBV,为核多角体病毒属成员。核酸类型为双链 DNA。

该病毒可感染对虾属(*Penaeus*)、明对虾属(*Fenneropenaeus*)、囊对虾属(*Metapenaeus*)和沟对虾属(*Melicertus*)等多种对虾。除卵和无节幼体,其余各生长阶段均易感染,且通常存在持续性感染。严重感染 MBV 的野生雌性斑节对虾产卵时,会排出含 MBV 的粪便,从而污染虾卵,将病毒传给下一代。MBV 在东亚、东南亚、印度次大陆、中东、澳大利亚、印度尼西亚、新喀里多尼亚、东非和马达加斯加均有分布,但在斑节对虾自然地理分布范围以外的野生对虾群体中未发现。

MBV 经肠道感染肝胰腺小管和中肠前段黏膜上皮细胞。受感染病虾在肝胰腺和中肠腺上皮细胞内,出现大量的核型多角体型包涵体或在粪便中有游离的多角体型包涵体。严重感染 MBV 的蚤状幼体、糠虾幼体和早期仔虾的中肠发白(这是由于在粪便中出现包涵体和细胞碎片)。稚虾、成虾及轻度感染的幼虾不出现病症。

附 录 C

(资料性)

斑节对虾杆状病毒 PCR 产物序列

1 AAATCCTAGGC GAICTTACCA AATACATTTC ATACCATAAC ACGTACCATG AACAACTTAT
 261F

61 CAATAAAAAGA GGATTTACTA TCTATCCAGA TGCTTTATTC ATGATCATCA TTATAAATAC

121 GCTCATGAGT TCAACACTTC CGACTATTAA AGGATCAATC AATATGAACT CTATTGAATC

181 TATGCTATTA CATGCGCTGA TTGAAATGAT GGTTAGTATT ACAACAATGA AGCTGGATAA

241 GGAGATGTTT ATCAACGAAC G
 261R

