



中华人民共和国国家标准

GB/T 40255—2021

对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 PCR 检测法

Code of diagnosis for infection with hepatopancreatic parvovirus of
penaeid shrimp—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、黄捷、余卫忠、史成银、张锋、宋晓玲、李清、张庆利、许华、李晨、刘莉。

对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程

PCR 检测法

1 范围

本文件规定了对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程中普遍适用的核酸检测技术的要求,针对肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus, HPV),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 HPV 带毒情况的定性检测,以进行对虾肝胰腺细小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:溴化乙锭(ethidium bromide)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)

HCl:盐酸(hydrogen chloride)

HPV:肝胰腺细小病毒(hepatopancreatic parvovirus)

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:分析纯。
- 5.3 TE 缓冲液:按 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(pH \geq 7.8):分析纯。
- 5.8 酚/氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1):分析纯。
- 5.9 氯仿/异戊醇(24 : 1):分析纯。
- 5.10 1 \times 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 $^{\circ}$ C 保存,用于 PCR。
- 5.13 10 \times PCR 缓冲液:生化试剂,无 Mg^{2+} 离子, -20 $^{\circ}$ C 保存。
- 5.14 $MgCl_2$ (25 mmol/L):生化试剂, -20 $^{\circ}$ C 保存。
- 5.15 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L):生化试剂, -20 $^{\circ}$ C 保存。
- 5.16 引物 HPV-F(10 μ mol/L):5'-GGT-GAT-GTG-GAG-GAG-AGA-3', -20 $^{\circ}$ C 保存。
- 5.17 引物 HPV-R(10 μ mol/L):5'-GTA-ACT-ATC-GCC-GCC-AAC-3', -20 $^{\circ}$ C 保存。扩增 HPV 核酸中的 628 bp 片段。
- 5.18 内参引物 CF(10 μ mol/L):5'-TGC-CTT-ATC-AGC-TNT-CGA-TTG-TAG-3', -20 $^{\circ}$ C 保存。
- 5.19 内参引物 CR(10 μ mol/L):5'-TTC-AGN-TTT-GCA-ACC-ATA-CTT-CCC-3', -20 $^{\circ}$ C 保存。扩增十足目生物 DNA 中的 848 bp 片段。
- 5.20 PCR 检测阳性对照为已知受 HPV 感染且 PCR 结果显示阳性的对虾组织, -70 $^{\circ}$ C 保存。
- 5.21 PCR 检测阴性对照为已知未受 HPV 感染且 PCR 结果显示阴性的对虾组织, -70 $^{\circ}$ C 保存。
- 5.22 PCR 检测空白对照以灭菌双蒸水作模板。
- 5.23 琼脂糖:生化试剂。
- 5.24 DNA 分子量标准:生化试剂。
- 5.25 6 \times 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 $^{\circ}$ 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

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)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 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；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 提取或暂时保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

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， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)混匀， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。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(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。

表 1 HPV 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
MgCl_2 (25 mmol/L)	4 μL	4 mmol/L
dNTPs(各 2.5 mmol/L)	2 μL	200 $\mu\text{mol/L}$
引物 HPV-F(10 $\mu\text{mol/L}$)	2.5 μL	1 $\mu\text{mol/L}$
引物 HPV-R(10 $\mu\text{mol/L}$)	2.5 μL	1 $\mu\text{mol/L}$
灭菌双蒸水	10.4 μL	—
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.1 μL	0.02 U/ μL
注: 25 μL 体系模板量 1 μL 。		

8.2.2 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 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min;最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

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(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 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 体系模板量 1 μL 。		

8.2.4 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 628 bp 处有特定条带,阴性对照在 628 bp 处无条带且空白对照不出现任何条带,实验有效。

9.2 检测结果判定

检测样品在 628 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 628 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 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 pH 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)

对虾肝胰腺细小病毒病简介

对虾肝胰腺细小病毒病(Infection with hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp)是由肝胰腺细小病毒(HPV)感染引起的对虾疾病,在病毒分类中属于细小病毒科(*Parvoviridae*),浓核病毒亚科(*Densovirinae*)。HPV 核酸为单链线性 DNA,基因组大小约 6 kb,由单一核衣壳蛋白包裹。病毒粒子无囊膜,正二十面体形,直径 22 nm~23 nm。基因组有 3 个开放阅读框(ORF),编码 2 个非结构蛋白和 1 个结构蛋白——核衣壳蛋白。目前,GenBank 数据库中已提交的 HPV 全基因序列有 5 条,分别为泰国株(DQ002873)、澳大利亚株(DQ458781)、印度株(FJ410797)、中国株(GU371276)和韩国株(JN082231)。HPV 不同地理株的基因序列分析数据表明 HPV 基因组存在较多的遗传变异情况。

自 1984 年新加坡首次报道 HPV 感染野生墨吉对虾(*Penaeus merguensis*)以来,其他国家及地区如:澳大利亚、韩国、菲律宾、马来西亚、肯尼亚、以色列、南北美洲及中国等均有 HPV 感染病例报道。

HPV 宿主范围广泛,主要的对虾养殖品种包括中国明对虾、印度明对虾(*F. indicus*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、斑节对虾(*P. monodon*)、墨吉对虾、细角滨对虾(*L. stylirostris*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*),在中国明对虾中尤为常见。病毒感染可导致幼虾死亡或引起矮小残缺综合征(RDS)。蟹类等其他甲壳类动物也可携带并传播该病毒。

受感染宿主肝胰腺细胞内可观察到 HPV 病毒包涵体,宿主细胞细胞核形成“帽状结构”,伴随在 HPV 包涵体旁。

附录 C

(资料性)

肝胰腺细小病毒 PCR 产物序列

1	TCCGACTCGA	GGG GGTGATG	TGGAGGAGAG	AATGTAACAA	TGCCTATGAA	GTATAAAGAA
			HPV-F			
61	CACAAGACTC	ATATGTTTCTAG	GAAGCCTGTA	TTTTTTGACTA	ATCAGCATCA	CCCATTGGTA
121	GACATATCAC	ATTATGATGA	CAGAAGAGCT	ATAGAGAATA	GAAGTTTCAT	GTATAAAGTA
181	GAGTTAGGAA	AGGAACCAGT	AAATGCACAT	ATAAAGTTTC	CTAATAGGAT	GATTCCAATC
241	AAGAAGAACC	AGAACTAACG	CAGTTTGTAT	TGGCCAGCAT	GCAGTATGTT	CATACAAACT
301	ATATGAACAG	ACCAGACAAG	AAGTTTAAAA	TTGGATTTTT	CAACAAGCTT	TATGACGCGC
361	TGTTTGTAGAA	CAGCTAAAAC	TATGTACGCA	GGGTTCAGT	TTTCCCGGCA	TAAATAAAGT
421	GATAAGATAA	GATTGAGAGT	TTGAATATCC	ACGTCACACA	CAAAGGTAGT	ATACCATGAG
481	TCTAGTATGG	GAGCAGTCGT	ATCTGCAGTT	GCTGCAGTAA	TAGCTGTAGT	AGTCGAAGTC
541	TCGAGTTCAT	AGTCGATGTC	GTGGAAGTGG	CTTTCGTGGT	GGCAGAAACT	GTACAGGTCTG
601	TTGCAGACAC	AGTCGATTAC	TTT GTTGGCG	GCGATAGTTA	CTGCGCCAGA	ACGATCAGAG
			HPV-R			
661	CAATCCGAAG	ACGGAGGGAG	CTAACGAAAT	TAACGACAGA	ACGACATC	

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程
PCR 检测法

GB/T 40255—2021

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2021年5月第一版

*

书号: 155066 · 1-66349

版权专有 侵权必究



GB/T 40255-2021