



中华人民共和国国家标准

GB/T 40257—2021

桃拉综合征诊断规程 RT-PCR 检测法

Code of diagnosis for infection with taura syndrome virus—RT-PCR method

2021-05-21 发布

2021-12-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

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：万晓媛、杨冰、黄健、李清、史成银、张锋、宋晓玲、余卫忠、张庆利、李晨、许华、刘莉。

桃拉综合征诊断规程 RT-PCR 检测法

1 范围

本文件规定了桃拉综合征诊断规程中普遍适用的核酸检测技术的要求,针对桃拉综合征病毒(taura syndrome virus, TSV),给出了 RT-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 TSV 带毒情况的定性检测,以进行桃拉综合征的流行病学调查、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)

cDNA:互补脱氧核糖核酸(complementary DNA)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)

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)

M-MLV:莫洛尼鼠白血病病毒(moloney-murine leukemia virus)

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

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

RT-PCR:逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction)

Taq:水生栖热菌(thermus aquaticus)

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

TSV:桃拉综合征病毒(taura syndrome virus)

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 DEPC 处理水:生化试剂。
- 5.3 TRIzol™ 总 RNA 提取试剂:生化试剂,或其他等效产品。
- 5.4 氯仿。
- 5.5 异丙醇。
- 5.6 无水乙醇。
- 5.7 无 RNA 酶的 75%乙醇:按附录 A 中 A.1 配制。
- 5.8 RNA 酶抑制剂(RNasin 或 RNase Inhibitor, 40 U/ μ L):生化试剂, -20 °C 保存。
- 5.9 M-MLV 逆转录酶(200 U/ μ L):生化试剂, -20 °C 保存。
- 5.10 5×M-MLV 逆转录酶缓冲液:生化试剂, -20 °C 保存。
- 5.11 dNTPs(各 10 mmol/L):生化试剂,含 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 各 10 mmol/L 的混合物, -20 °C 保存,用于逆转录。
- 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/ μ L):生化试剂, -20 °C 保存。
- 5.16 引物 9992F(10 μ mol/L):5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'。
- 5.17 引物 9195R(10 mol/L):5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'。
- 5.18 RT-PCR 检测阳性对照:已知受 TSV 感染且 RT-PCR 结果显示阳性的对虾组织样品, -80 °C 保存。
- 5.19 RT-PCR 检测阴性对照:已知未受 TSV 感染且 RT-PCR 结果显示阴性的对虾组织样品, -80 °C 保存。
- 5.20 RT-PCR 检测空白对照:DEPC 处理水。
- 5.21 50×电泳缓冲液:按 A.2 配制。
- 5.22 1×电泳缓冲液:按 A.3 配制。
- 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.4 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 高速冷冻离心机。
- 6.6 水浴锅或金属浴。
- 6.7 普通冰箱。

- 6.8 —80℃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 L。

7 样品

7.1 采样对象

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和细角滨对虾(*L. stylirostris*)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；幼虾至成虾阶段取去除眼柄的头胸甲(淋巴器官、鳃丝、触角腺等)和附肢。

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 无 RNA 酶离心管中，立即进行 RNA 提取操作或加入相应体积 TRIzol™ 总 RNA 提取试剂，暂时保存于—20℃。

8 试验步骤

8.1 RNA 的提取

8.1.1 取 30 mg~50 mg 样品，加入 0.5 mL~1 mL TRIzol™ 总 RNA 提取试剂，研磨，室温放置 5 min。4℃，12 000 r/min 离心 5 min。取上清至新的无 RNA 酶离心管中。提取过程同时设置阳性对照和阴性对照。

8.1.2 加入 1/5 体积的氯仿，混合至溶液乳化呈乳白色，室温放置 5 min。

8.1.3 4℃，12 000 r/min 离心 15 min。仔细吸取上层水相，移至新的无 RNA 酶离心管中。

8.1.4 加入等体积的异丙醇，上下颠倒混匀，室温放置 10 min。

8.1.5 4℃，12 000 r/min 离心 10 min，弃上清。

8.1.6 加入 1 mL 无 RNA 酶的 75%乙醇(4℃预冷)，上下颠倒洗涤沉淀，再于 4℃，7 000 r/min 离心 5 min，小心弃上清。室温晾干沉淀。

8.1.7 加入 20 μL~100 μL DEPC 处理水溶解沉淀，立即用于 RT-PCR 或保存于—80℃备用。

8.2 RT-PCR 操作

8.2.1 配制逆转录引物预混液体系，分装为 5 μL/管，使每反应管含 4 μL DEPC 处理水、1 μL 10 μmol/L 引物 9195R，保存于—20℃。临用前，加入 1 μL(质量浓度：1 ng/μL~1 000 ng/μL)待测 RNA 样品。70℃预变性 10 min 后，即刻放入冰浴中冷却 2 min。同时设置以 DEPC 处理水为模板的空白对照。

8.2.2 配制逆转录酶预混物，配制方法为：2 μL 5× M-MLV 逆转录酶缓冲液、0.5 μL dNTPs(各 10 mmol/L)、0.25 μL RNase Inhibitor(40 U/μL)、0.5 μL M-MLV 逆转录酶(200 U/μL)，加 0.75 μL DEPC 处理水补足至 4 μL，混匀后，加至 8.2.1 中的样品管，稍离心，置于 42℃水浴锅或金属浴中反应 1 h，70℃15 min 后，可获得 cDNA 模板。

8.2.3 PCR 反应体系:按照表 1 的要求,配制成除 *Taq* DNA 聚合酶以外的大体积预混物,分装保存于一 20 ℃。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。分别加入相应体积的各样品逆转录 cDNA。

8.2.4 将上述加有逆转录 cDNA 的 PCR 管按以下程序进行扩增:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s、60 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s,40 个循环;72 ℃延伸 5 min;4 ℃保温。

8.2.5 可使用同等效果的逆转录或一步法 RT-PCR 商品化试剂盒进行操作。

表 1 RT-PCR 的 PCR 反应预混物所需试剂·组成

试剂	25 μL 体系	试剂终浓度
10× PCR 缓冲液(无 Mg ²⁺)	2.5 μL	1× PCR 缓冲液
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2 μL	2 mmol/L
dNTPs(各 2.5 mmol/L)	2 μL	200 μmol/L
引物 9992F(10 μmol/L)	1 μL	0.4 μmol/L
引物 9195R(10 μmol/L)	1 μL	0.4 μmol/L
灭菌双蒸水	15.2 μL	—
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.3 μL	0.06 U/μL
注: 25 μL 体系的模板为 1 μL 逆转录 cDNA。		

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 μg/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×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

阳性对照在 231 bp 处有特定条带、阴性对照在 231 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 231 bp 处有条带,且 PCR 产物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 RT-PCR 结果阳性;检测样品在 231 bp 处无条带可判为 RT-PCR 结果阴性。

附 录 A
(规范性)
试 剂 配 方

A.1 无 RNA 酶的 75%乙醇

无水乙醇(新开瓶)	75 mL
加入 DEPC 处理水	25 mL

在无 RNA 酶的玻璃量筒中配制,混匀,按 1 mL/支~1.2 mL/支分装于无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中,保存于-20 ℃待用。

A.2 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.3 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.4 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)

桃拉综合征简介

桃拉综合征(infection with taura syndrome virus)是由桃拉综合征病毒(TSV)引起的对虾严重流行病。TSV 的形态为正二十面体结构,直径 32 nm,无囊膜,氯化铯浮力密度 1.338 g/mL,在细胞质内复制,核酸为正链单股线性 RNA,长度约 10 205 个核苷酸,其衣壳主要由三种多肽(VP1、VP2 和 VP3)组成。TSV 至少包括四个基因群,分别是美洲群、东南亚群、伯利兹群和委内瑞拉群。

目前,TSV 广泛分布于美洲、东南亚和中东等对虾养殖地区。1992 年,厄瓜多尔养殖的凡纳滨对虾中首次发生 TSV 感染疫情。随着受感染仔虾和亲虾运输,TSV 快速传播到美洲。1999 年,传入中国台北,继而影响中国大陆、泰国、马来西亚和印度尼西亚,并成为各地区对虾高死亡率的主要流行病原。

TSV 易感品种包括细角滨对虾、凡纳滨对虾、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)、褐对虾(*Penaeus aztecus*)、斑节对虾(*P. monodon*)、白对虾(*P. setiferus*)。主要感染 14 日~40 日龄仔虾。稚虾或成虾初次遇到病毒时也易被感染。

感染分三个不同阶段,即:急性期、过渡期和慢性期,且各阶段症状明显不同。

急性期:TSV 急性感染期的濒死凡纳滨对虾全身呈浅红色,尾扇和泳足呈鲜红色,亦曾被俗称为“红尾病”。对虾常在蜕皮时死亡,且在蜕皮阶段晚期出现壳变软、空肠等典型症状。因濒死虾多漂浮于池边或水面,疫病暴发高峰期间可见数以千计的海鸟(海鸥、燕鸥、苍鹭、鸬鹚等)聚集在池边或水面捕食病虾。经显微镜观察病虾附肢(如末端尾肢或腹肢),可见病灶处表皮上皮坏死。

过渡(恢复)期:该时期的种群中可能仍有尚多急性感染期对虾,死亡率仍很高。虾池中,可见对虾表皮随机出现多处不规则的由血细胞积累而成的黑色病灶,表皮变软及红色素扩散,行为和摄食保持正常。

慢性期:过渡期的病虾在蜕皮后转入慢性期,病毒感染持续,但无明显症状。此感染期的细角滨对虾对正常环境刺激(如盐度突然降低等)的抵抗力低于无感染对虾。该期唯一典型病变为淋巴组织扩大,并出现多个淋巴器官小球(LOS)。当怀疑 TSV 慢性感染时,可结合分子生物学方法进行确诊。

附录 C

(资料性)

桃拉综合征病毒 RT-PCR 产物序列

1 CTTTGGGCAA AGTAGACAGC CGCGCTTGCG TGGTGGGACT TAATTAATGC CTGCTAACCC
9992F

61 AGTTGAAATT GATAATTTTG ATACAACAAC CAGTGGAGGA CTAATTCCAG GAGGTAGTGT

121 TACAAACAGT GAAGGTTCTA CAATCTTGAT GAATGATATC CCAATCACTA ATCAGAATGT

181 AGTGCTGTCT AAGAATGTAA CAGATAACCT GTTTGAAGTC CAGGACCAAG CTCTCAATTGA
9195R

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
桃拉综合征诊断规程 RT-PCR 检测法
GB/T 40257—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 · 1-66308

版权专有 侵权必究



GB/T 40257-2021



码上扫一扫 正版服务到