

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1673—2013

代替 SN/T 1673—2005

### 传染性皮下和造血器官坏死 检疫技术规范

Quarantine protocol for infectious hypodermal and haematopoietic necrosis

2013-08-30 发布

2014-03-01 实施



中 华 人 民 共 和 国 发 布  
国家质量监督检验检疫总局

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1673—2005《对虾传染性皮下和造血器官坏死病毒聚合酶链反应操作规程》。

本标准与 SN/T 1673—2005 相比,除编辑性修改外主要技术性变化如下:

- 增加了临床诊断;
- 增加了实时荧光 PCR 方法;
- 增加了斑点杂交方法;
- 增加了原位杂交方法;
- 增加了综合评定。

本标准主要参考 OIE 标准《水生动物疾病诊断手册》(2009 年版)第 2.2.2 章中介绍的方法。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国海南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:张娜、何俊强、黄纪徽、卓金焕、郑枢、史秀杰、庄广儒、曾建红。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1673—2005。

# 传染性皮下和造血器官坏死 检疫技术规范

## 1 范围

本标准规定了进出口对虾中传染性皮下和造血器官坏死的现场检疫和聚合酶链式反应(PCR)、实时荧光 PCR 方法、原位杂交方法和斑点杂交方法实验室检验方法。

本标准适用于进出口对虾中传染性皮下和造血器官坏死的流行病学调查、诊断、检疫和疫情监测。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

IHHN:传染性皮下和造血器官坏死

IHHNV:传染性皮下和造血器官坏死病毒

PCR:聚合酶链式反应

Real-Time PCR:实时荧光 PCR

RDS:慢性矮小残缺综合症

## 4 概述

传染性皮下和造血器官坏死(IHHN)是由传染性皮下和造血器官坏死病毒(IHHNV)引起的,IHHN 的流行病学、病原特性等参见附录 A。

## 5 实验室诊断

### 5.1 仪器和设备

5.1.1 PCR 扩增仪。

5.1.2 紫外观察灯或凝胶成像仪。

5.1.3 荧光定量 PCR 仪。

5.1.4 高速冷冻离心机。

5.1.5 玻璃研磨棒或塑料研磨棒。

5.1.6 水浴锅:室温至 100 ℃。

5.1.7 塑料封口机:可满足 5 cm 以上杂交袋热塑封口,溶液溢出到电阻丝或外壳上时不会发出漏电。



- 5.1.8 暗盒:可用任何能避免强光直射的盒子或袋子代替。
- 5.1.9 硝酸纤维素膜。
- 5.1.10 杂交袋。
- 5.1.11 电炉或其他加热设备:可满足 200 mL~2 000 mL 水在敞口容器中沸腾 10 min。
- 5.1.12 程控组织脱水机或常规手工脱水。
- 5.1.13 程控组织包埋机或常规手工包埋。
- 5.1.14 展片水浴锅:室温~50 ℃。
- 5.1.15 切片烘干机:室温~100 ℃。
- 5.1.16 切片染色缸。
- 5.1.17 切片保湿孵育箱。

## 5.2 试剂和材料

5.2.1 所用水若非注明,应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

5.2.2 若非注明,本标准使用试剂为分析纯。

5.2.3 聚合酶链式反应(PCR)扩增反应引物

a) PCR 扩增引物:

389F:5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'

389R:5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'

浓度为 40 μmol/L,扩增长度为 389 bp 的基因片段(参见附录 B)。

b) PCR 扩增引物:

77012F:5'-ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA-3'

77353R:5'-TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC-3'

浓度为 40 μmol/L,扩增长度为 356 bp 的基因片段。

c) PCR 扩增引物:

392F:5'-GGG-CGA-ACC-AGAATC-ACT-TA-3'

392R:5'-ATC-CGG-AGG-AAT-CTGATG-TG-3'

浓度为 40 μmol/L,扩增长度为 392 bp 的基因片段。

d) PCR 扩增引物:

309F:5'-TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A-3'

309R:5'-TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A-3'

浓度为 40 μmol/L,扩增长度为 309 bp 的基因片段。

e) PCR 扩增引物:

MG831F:5'-TTG-GGG-ATG-CAG-CAA-TAT-CT-3'

MG831R:5'-GTC-CAT-CCA-CTG-ATC-GGA-CT-3'

浓度为 40 μmol/L,扩增长度为 831 bp 的基因片段。

5.2.4 实时荧光 PCR 扩增引物和 Taqman 探针

a) 实时荧光 PCR 引物:

上游引物(IHHNV1608F)5'-TACTCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A-3'

下游引物(IHHNV1688R)5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-3'

引物浓度为 7.5 μmol/L。

b) Taqman 探针:探针浓度为 7.5 μmol/L

5'Fam-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-TAMRA 3'

探针浓度为 7.5 μmol/L。



### 5.2.5 对照设立

- a) 阳性对照:取含有已知 IHNV 的对虾组织作为阳性对照,或由国家质量监督检验检疫总局指定单位提供。
- b) 阴性对照:取已知未含 IHNV 的对虾组织抽提核酸作为阴性对照。
- c) 空白对照:取等体积的水代替模板作为空白对照。

5.2.6 抽提液 I:饱和过的重蒸酚:三氯甲烷:异戊醇按 25:24:1 的比例混合。

5.2.7 抽提液 II:三氯甲烷和异戊醇按 24:1 的比例混合。

5.2.8 dNTP:含 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 各 10 mmol/L;6×上样缓冲液。

5.2.9 Taq 酶:5 U/μL;MgCl<sub>2</sub>:25.0 mmol/L;−20 ℃保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。

5.2.10 EB(核酸染色剂)。

5.2.11 DNA 标准分子量。

5.2.12 荧光 PCR 反应混合液: TaqMan Universal PCR Master Mix(美国应用生物系统公司产品或等效产品),包含 Ampli Taq Gold DNA polymerase、Amp Erase UNG、dNTPs、dUTP 以及优化的 PCR 反应成分。

5.2.13 DIG 标记的核酸探针(德国 Boehringer Mannheim 公司产品或等效产品)。

5.2.14 碱性磷酸酶标记的 DIG 抗体(Roche Diagnostics 1-093-274 或等效产品)。

5.2.15 核酸探针斑点杂交阳性对照:已知受 IHNV 感染、组织病理学上有明显 IHNV 病灶且核酸探针斑点杂交检测呈明显阳性结果的对虾样品组织匀浆上清液或血淋巴。

5.2.16 核酸探针斑点杂交阴性对照:已知未受 IHNV 感染且核酸探针斑点杂交检测呈明显阴性结果的对虾样品组织匀浆上清液或血淋巴。

### 5.3 临床症状

患有急性 IHNV 的细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)摄食明显减少,外观及行为表现异常,患病对虾在养殖池中缓缓上升到水面,静止后翻转继而又缓慢沉到水底,腹部向上,出现这种行为的对虾在几小时内不断重复这个过程,直到体力不支或被其他健康对虾攻击和吞食。感染期的细角滨对虾表皮上皮,特别是腹部背板接合处经常出现白色或浅黄色的斑点(该斑点的形状及出现部位与对虾白斑综合征的特征性白斑不同),使对虾看上去体色斑驳。继而这种斑点会逐渐消退。同时,感染了 IHNV 的细角滨对虾和斑节对虾(*Penaeus monodon*)在濒死时体色常偏蓝,腹部肌肉不透明。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染 IHNV 后表现为 RDS,主要影响是患病对虾生长缓慢,表皮畸形,但死亡率很低。养殖的细角滨对虾和斑节对虾也会患 RDS。稚虾或大一些的凡纳滨对虾患慢性矮小残缺综合症的严重程度及流行与幼体或仔虾阶段的早期感染有关。患病稚虾表现额角弯曲、变形,触角鞭毛皱起,表皮粗糙或残缺。患 RDS 的稚虾大小差异很大,且一般比正常的对虾短小。

### 5.4 聚合酶链式反应(PCR)

#### 5.4.1 取样和制样

5.4.1.1 取活虾或濒死的对虾组织作为样品,死亡 2 h 后不可采用。处理前要将样品放在冰上。如果 2 h 以后才能处理,应将样品保存在 10 倍以上体积的 95%乙醇中,放置在室温下可保存 1 个月。

5.4.1.2 仔虾或稚虾:取整只虾或虾头作样品。取虾头时,用灭菌剪刀和镊子去除眼睛、头胸甲、所有的胸部附器和头部以后的腹部。

5.4.1.3 成虾取鳃丝、上皮、肝胰腺或肠,或取附肢或血淋巴作为样品:取附肢时,用灭菌剪刀剪去头部和腹部两面三刀侧的附肢,如触角、颚足、步足和游泳足,用小剪刀剪碎。样品保存在−20 ℃。

取血淋巴时,先用 1 mL 针管吸取 500 μL 10%的柠檬酸盐(见附录 C 的 C.1)溶液,然后在针管前插上一个 26 号的针头。抓住对虾,使腹部朝上。将针头水平地插入第一和第二对游泳足之间,并一直插到最后一对胸部附器的凹陷处。缓慢吸取血淋巴。血淋巴样品需保存在−70 ℃。



#### 5.4.2 病毒 DNA 抽提

取样品 50 mg~100 mg,加入 100  $\mu$ L~200  $\mu$ L 的蛋白酶 K(见 C.2)溶液,混匀后用于 55  $^{\circ}$ C 作用直至组织完全消化,再加 CTAB 溶液(见 C.3)至 900  $\mu$ L,混匀后于 25  $^{\circ}$ C 作用 2 h;加入 600  $\mu$ L 提取液 I,充分混合至少 30 s。12 000 r/min 离心 5 min,取上层水相;加入 700  $\mu$ L 提取液 II,充分混合至少 30 s。12 000 r/min 离心 5 min,取上层水相;加入 1.5 倍体积的-20  $^{\circ}$ C 无水乙醇,混匀后,-20  $^{\circ}$ C 放置 6 h 以上,15 000 r/min 离心 30 min,弃上清,立即用滤纸吸干,37  $^{\circ}$ C 干燥 30 min;最后加 12  $\mu$ L 水溶解后,作为 PCR 模板。也可以使用其他等效试剂盒和其他方法抽提病毒 DNA。

#### 5.4.3 设立对照

样品核酸抽提过程按 5.2.5 设立阳性对照、阴性对照和空白对照。

#### 5.4.4 配备反应混合物

反应体系为 100  $\mu$ L:10 $\times$ PCR 缓冲液 10  $\mu$ L, $Mg^{2+}$  (25.0 mmol/L)10  $\mu$ L,引物(40  $\mu$ mol/L)上下游引物各 2.5  $\mu$ L,dNTP(10 mmol/L)2  $\mu$ L,*Taq* 酶 1  $\mu$ L,模板 10  $\mu$ L,然后加水至总体积到 100  $\mu$ L,振荡混匀后稍离心,使液体集中在底部,再将反应管至于 PCR 仪器中

#### 5.4.5 PCR 扩增

按照以下程序进行扩增:94  $^{\circ}$ C 4 min 预变性;然后进行 32 次循环(94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,55  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min),72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4  $^{\circ}$ C 保温。

#### 5.4.6 琼脂糖电泳

用 TBE 缓冲液(见 C.4)配制成 1.5%的琼脂糖(含 0.5  $\mu$ g/mL EB),胶厚 0.5 cm。将平板放入水平电泳槽,电泳缓冲液刚好淹没胶面。将 8  $\mu$ L 样品和 2  $\mu$ L 样品缓冲液,混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 标准分子量作对照。20 mA~30 mA 电泳约 0.5 h,溴酚蓝到达底部时停止。紫外灯下观察核酸带。

#### 5.4.7 结果判定

5.4.7.1 在紫外观察灯上或用凝胶成像仪观察扩增带并判断结果。

5.4.7.2 如果阳性对照在相应位置上出现扩增带,而阴性对照和空白对照无扩增带,实验成立。

5.4.7.3 首先使用引物 389 F 和 389 R 进行扩增,如果出现 389 bp 条带时,可用其他两对引物 77 012 F 和 77 353 R、392 R 和 392 F 进行 PCR 复核,如果同样出现 356 bp、392 bp 条带时,将 PCR 产物进行序列测定。序列测定的结果同 GenBank 中参考序列进行比较(序列参见附录 B),如果序列同源性在 95%以上,可进一步确认待测样品结果为阳性。

5.4.7.4 在样品检测结果是阳性时,用引物 309 F/R 和引物 MG831F/R 进行 IHNV 分型检测。如果用引物 309 F/R 扩增出现 309 bp 条带时,认定样品是 IHNV I 型和 II 型;如果用引物 MG831F/R 扩增出现 831 bp 条带时,认定样品是 IHNV III 型。

5.4.7.5 无扩增带或扩增带的大小与预计的大小不一致为阴性。结果可疑时,可补充组织病理学诊断或实时荧光 PCR 技术诊断或原位杂交技术进行诊断确认。

### 5.5 实时荧光 PCR

#### 5.5.1 取样和制样

具体见 5.4.1。



### 5.5.2 DNA 模板准备

具体见 5.4.2。

### 5.5.3 实时荧光 PCR 反应体系配制

在 0.2 mL PCR 薄壁管或八联管中,按每个样品  $10 \times TaqMan$  Universal PCR Master Mix  $2.5 \mu\text{L}$ 、上游引物(IHHNV1608F)  $1 \mu\text{L}$ 、下游引物(IHHNV1688R)  $1 \mu\text{L}$ 、探针  $0.5 \mu\text{L}$ 、DNA 模板  $2 \mu\text{L}$ 、水(无 DNase)  $18 \mu\text{L}$  配制成总体积为  $25 \mu\text{L}$  的 Real-time PCR 检测体系。同时设置不含 DNA 模板的空白对照、IHHNV 阳性对照和阴性对照。

### 5.4.4 实时荧光 PCR 反应

将加样后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内,记录样本摆放顺序。

反应参数设置:第一阶段,预变性  $95^\circ\text{C}$  10 min;第二阶段,  $95^\circ\text{C}$  15 s,  $60^\circ\text{C}$  1 min, 40 个循环,荧光收集设置在第二阶段每次循环的退火延伸时进行。

### 5.5.5 结果判定

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点。

阴性对照和空白对照应无 Ct 值并且无扩增曲线,阳性对照的 Ct 值应  $\leq 40$ ,并出现特定的扩增曲线。否则实验无效。

待检样品的 Ct 值  $\leq 40$  个循环并且出现特定的扩增曲线,结果判定为样品阳性;待检样品 Ct 值  $> 40$  个循环,结果判定为阴性。待检样品 Ct 值介于 35 和 40 之间时,应重新进行实时荧光 PCR 检测。若重新检测的 Ct 值  $\geq 40$  时,则判断样品阴性。若重新检测的 Ct 值仍介于 35 和 40 之间,则判断样品阳性。

## 5.6 斑点杂交

### 5.6.1 取样与制样

5.6.1.1 取对虾的个体(适用于 3 cm 以下幼虾、仔虾、幼体或受精卵)或对虾的附肢、胃、血淋巴或鳃丝组织(适用于活体或冷冻的成虾)样品。

5.6.1.2 整虾、虾头或附肢样品约 0.1 g,置于 1.5 mL 微型离心管中,加入 0.3 mL TN 研磨液(见 C.5),用研磨棒将样品充分研磨后,  $8\,000\text{ r/min} \sim 10\,000\text{ r/min}$  离心 2 min,取上清液备用。

5.6.1.3 在 1.5 mL 的微量离心管中,  $1 \mu\text{L}$  样品加  $9 \mu\text{L}$  TE 缓冲液(见 C.6)(含  $50 \mu\text{g/mL}$  鲑鱼精子 DNA)稀释待测样品。

5.6.1.4 样品在沸水中煮沸 10 min,快速放在冰上粹冷 5 min。在冷却状态下短时离心使所有的液体集中在底部,并使凝集的蛋白沉淀。点样前要把样品一直放在冰上。

### 5.6.2 操作方法

5.6.2.1 根据待检样品数量以及阴性对照和阳性对照总数量,隔着衬纸在硝酸纤维素膜上用软铅笔划格,每样为  $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$  小格,沿框线将所需大小的杂交膜剪下,一式两张。左上角剪角的一张为测试膜,左上角用软铅笔点点标记的为对照膜。

5.6.2.2 将测试膜和对照膜飘浮于双蒸水表面,使其沉入水中吸水 10 min,然后浸泡于  $20 \times \text{SSC}$ (见 C.7)中 5 min,取出膜置于滤纸上晾干。

5.6.2.3 每个样品分别取  $1 \mu\text{L}$  点到测试膜和对照膜的相应位置上,自然晾干,将测试膜和对照膜夹于



两张滤纸中间,放于 80 ℃ 烘烤 30 min 或紫外线照射 3 min 固定样品。

5.6.2.4 把水浴锅温度调整到 68 ℃,根据测试膜和对照膜的面积大小准备所需的预杂交液(见 C.8)(每片 10 cm×15 cm 的膜需要 8 mL 溶液)。把电热搅拌器的振荡频率调到“低”,搅拌、加热 30 min,直到块状的试剂溶解。

5.6.2.5 从烘箱或紫外灯下中取出测试膜和对照膜分别放于两只杂交袋中,加入 5.6.2.4 准备好的预杂交液,封口后,放在 68 ℃ 水浴 0.5 h~1 h。

5.6.2.6 将地高辛标记的探针煮沸 10 min,放在冰上冷却。低温下稍离心,使液体集中在底部,放回冰上。从杂交袋中吸掉原有杂交液,每张膜中加入 2 mL 新配制的预杂交液,在测试膜中再加入 40 ng 的地高辛标记的探针,边加边充分混合,而对照膜不加探针。封口后放回 68 ℃ 水浴锅中反应 8 h~12 h。

5.6.2.7 完全剪开杂交袋,取出 5.6.2.6 中的测试膜和对照膜,室温下,在平皿中用 2×SSC/0.1% SDS(见 C.9)洗涤测试膜和对照膜两次,每次 5 min,间歇摇晃。

5.6.2.8 根据测试膜和对照膜的面积大小准备所需的 0.1×SSC/0.1% SDS(见 C.10)(0.5 mL/cm<sup>2</sup>);取出 5.6.2.7 中的测试膜和对照膜,分别置于两只新的杂交袋中,用微量移液器加入 0.1×SSC/0.1%SDS,68 ℃ 水浴中孵育 15 min,洗涤 3 次,每次洗后换一新的杂交袋。

5.6.2.9 取出杂交袋中的测试膜和对照膜,室温下,在平皿中用 Buffer I(见 C.11)洗涤测试膜和对照膜一次,5 min,间歇摇晃。

5.6.2.10 将测试膜和对照膜分别装于两只新的杂交袋中,加入 Buffer II(见 C.12)室温放置 30 min。然后再将膜分别装于两只新的杂交袋中,加入 Buffer I,室温放置 5 min。

5.6.2.11 测试膜和对照膜的袋子中每张膜加 3 mL 用 Buffer I 稀释到 1/5 000 的碱性磷酸酶标记的 DIG 抗体,放在振荡器上,室温下振荡 30 min~45 min。

5.6.2.12 完全剪开杂交袋,取出测试膜和对照膜,在平皿中用 Buffer I 室温下洗涤测试膜和对照膜 2 次,每次 15 min,间歇摇晃。再用 Buffer III(见 C.13)室温下洗涤测试膜和对照膜 5 min,间歇摇晃。

5.6.2.13 将测试膜和对照膜分别装于两只新的杂交液中,分别加入 3 mL 临用前配好的显色液 I(见 C.14)室温下在暗处反应 1 h~2 h。在显色过程中,可短时间取出膜进行观察,勿搅动,观察后立即放回。

5.6.2.14 在测试膜上阳性对照样品明显出现颜色且测试膜和对照膜有所变色时,立即剪开杂交袋,取出膜,用 Buffer IV(见 C.15)终止反应,把膜放在滤纸上晾干。对光观察,记录结果。

### 5.6.3 结果判定

5.6.3.1 检测结果的判定要将测试膜与对照膜对照进行。测试膜上阳性对照样品的显色应为淡蓝褐色,阴性对照样品应无色。参照膜上阳性对照和阴性对照均无色或膜上出现黄色、红色等颜色都不是病毒存在导致的显色结果。

5.6.3.2 测试膜上斑点显蓝褐色,而对照膜对应斑点不显色或颜色比测试膜上浅得多时,该样品判断为阳性,该结果提示活虾和敏感宿主已被 IHNV 感染,或对虾产品及其他产品曾被 IHNV 感染;测试膜斑点不显色,该样品判断为阴性;测试膜与对照膜均有明显的颜色,则该样品由于样品处理的问题存在明显的非特异性反应干扰,测试结果无法判断,应重新检测。

## 5.7 原位杂交

### 5.7.1 操作方法

5.7.1.1 将活的对虾个体(适用于仔虾、幼体或受精卵)置于 Davidson's AFA 固定液(见 C.16)中固定;对于活幼虾或成虾,则用洁净锋利的刀片将其头胸部切为两半,将其中一半置于 Davidson's AFA



固定液中固定,24 h后置于70%乙醇中。每次实验都要设立阳性对照和阴性对照。

5.7.1.2 将样品置于程控组织脱水机中进行脱水、透明、浸蜡,在程控石蜡包埋机上进行包埋(也可使用手工脱水和包埋步骤),用石蜡切片机进行切片,厚度5  $\mu\text{m}$ ,用毛笔将切片移入展片水浴锅内展片,用已预包被500  $\mu\text{g/mL}$ 多聚赖氨酸(见C.17)载玻片捞出,放在玻片架上,置于切片烘片机60  $^{\circ}\text{C}$ 烘烤45 min。

5.7.1.3 将组织切片(包括阳性对照和阴性对照)在切片染色缸中依次通过二甲苯(3次,5 min)、无水酒精(2次,1 min/次)、95%酒精(2次,10 s/次)、80%酒精(2次,10 s/次)、50%酒精(1次,10 s/次)、蒸馏水漂洗6次(不要让切片干燥)。

5.7.1.4 用磷酸盐缓冲液(PBS)(见C.18)漂洗载玻片5 min。将载玻片置于湿盒内,每张切片加入1 mL用PBS制备的100  $\mu\text{g/mL}$ 新鲜蛋白酶K(见C.19),37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min后,用吸水纸吸干。

5.7.1.5 把玻片放回玻片架,室温下用0.4%冷甲醛固定切片5 min。

5.7.1.6 将切片放在2 $\times$ SSC的切片染色缸中室温下培养5 min。

5.7.1.7 把玻片放平,加0.5 mL~1 mL预杂交缓冲液(见C.20),37  $^{\circ}\text{C}$ 在湿盒中培养15 min~30 min。

5.7.1.8 把地高辛标记的探针煮沸10 min,放在冰上冷却,在冷却状态下稍振荡后放回冰上。用预杂交液将探针稀释到25 ng/mL,取250  $\mu\text{L}$ 加到切片上,42  $^{\circ}\text{C}$ 反应2 h~4 h或放在湿盒中37  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用吸水纸吸干。在反应时把漂洗缓冲液置于37  $^{\circ}\text{C}$ 预热。

5.7.1.9 把玻片放在玻片架上,按下列程序漂洗:2 $\times$ SSC(2次,5 min/次,37  $^{\circ}\text{C}$ )、1 $\times$ SSC(2次,5 min/次,37  $^{\circ}\text{C}$ )、0.5 $\times$ SSC(2次,5 min/次,37  $^{\circ}\text{C}$ )。

5.7.1.10 把玻片放在缓冲液I中室温下漂洗5 min,置湿盒中放平,每个玻片加0.5 mL Buffer II封闭,37  $^{\circ}\text{C}$ 下培养15 min,用吸水纸吸干。

5.7.1.11 用缓冲液II将碱性磷酸酶标记的DIG抗体,稀释1 000倍。每个组织切片加500  $\mu\text{L}$ ,置湿盒内37  $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min。

5.7.1.12 把玻片放在玻片架上,室温下用缓冲液I漂洗2次,每次5 min,用吸水纸吸干。再用缓冲液III漂洗1次,每次5 min~10 min。

5.7.1.13 制备显色液II(见C.21),每个玻片中加入500  $\mu\text{L}$ 显色液II,置湿盒中,室温下在暗环境里反应2 h~3 h。在显色过程中,可短时间取出组织切片在显微镜下观察,当阳性对照明显显色时可终止反应。

5.7.1.14 用微量移液器吸去组织切片上的显色液II,把玻片放回玻片架,室温下置于1 $\times$ 缓冲液IV中15 min,终止显色反应。

5.7.1.15 在切片染色缸中,依次用蒸馏水(10 s)、0.5%俾斯麦棕-Y(Bismarck brown Y)(见C.22)(5 min)、95%酒精(3次,10 s/次)、纯酒精(3次,10 s/次)、二甲苯(4次,10 s/次)浸洗组织切片(勿让切片干燥,可以使切片始终放在二甲苯中,直到封片)。

5.7.1.16 往每一组织切片上滴加两滴中性树胶,封片。

## 5.7.2 结果判定

5.7.2.1 受IHHNV感染的细胞显示阳性反应,即细胞核内有较深的蓝黑色沉淀,而阴性对照的细胞核着色为浅棕色。感染程度越深,则着色越明显。

5.7.2.2 阳性对照样品不出现蓝黑色到黑色细胞沉淀物,或阳性对照样品和阴性对照样品均出现显色反应相当的明显非特异性反应,判断检测结果无效,应重新取样检测。



## 6 综合评定

6.1 临床诊断符合 5.3 描述的症状的样品,使用斑点杂交、原位杂交、PCR 和荧光 PCR 等方法中的任何一种方法的检测结果为阳性的均可判为阳性。

6.2 临床诊断不符合 5.3 描述的症状的样品,当 PCR 检测为阳性时,还需要进行测序与标准序列比对相似性在 95%以上,才能判为阳性。

6.3 基因分型判定:经 PCR 确认为阳性后,同时使用 309F/309R 和 MG831F/MG831R 引物进行基因分型判定。如用 309F/309R 扩增,结果为阳性,则判定为感染有传染性皮下和造血器官坏死病毒 I 型和 II 型。如用 MG831F/MG831R 扩增,结果为阳性,则判定为感染有传染性皮下和造血器官坏死病毒 III 型。



## 附录 A

## (资料性附录)

## 传染性皮下和造血器官坏死概述

传染性皮下和造血器官坏死病是由传染性皮下和造血器官坏死病毒(IHHNV)引起的。IHHNV 隶属于细小病毒科短核病毒属,国际病毒分类委员会暂定种名为 PstDNV(for *Penaeus stylirostris* densovirus),但 OIE 仍然用 IHHNV 的名称。IHHNV 是目前已知的最小的对虾病毒。病毒粒子大小为 20 nm~22 nm,是无囊膜的二十面体,在 CsCl 中的浓度为 1.40 g/mL,线性单链 DNA,估计长度为 4.1 kb,核衣壳蛋白至少由 4 个分子量分别为 74 kD、47 kD、39 kD、37.5 kD 的多肽组成。

地理分布:IHHNV 可感染世界各地养殖对虾,太平洋东部沿岸从秘鲁到墨西哥的野生对虾中发现有 IHHNV,太平洋岛屿包括夏威夷群岛、法属波利尼西亚、关岛和新卡里多尼亚养殖对虾中也发现有 IHHNV 感染,IHHNV 还可感染东亚、东南亚和中东地区的养殖对虾和野生虾(Lighnter,1996)。

临床症状:大部分的对虾都有可能感染 IHHNV,包括目前饲养较多的斑节对虾、南美白对虾和红额角对虾等对虾品种。IHHNV 感染太平洋蓝虾和红额角对虾后,可以引起大暴发和高死亡率(>90%),红额角对虾从稚虾到接近成虾是受影响最严重的阶段。垂直感染 IHHNV 的幼体和早期的仔虾不会表现出症状,但大约 35 日龄后到稚虾期就可能观察到发病的症状,接着就会出现大量死亡。水平感染的稚虾会引起急性流行并会大量死亡,其潜伏期的长短和疾病的严重程度取决于虾的大小和日龄,小一些的稚虾最严重,而受感染的成虾很少表现出发病症状或死亡。患有急性 IHHN 的红额角对虾摄食明显减少,外表及行为表现异常,患病对虾在养殖池中缓缓上升到水面,静止后翻转继而又缓慢沉到水底,腹部向上,出现这种行为的对虾在几小时内不断重复这个过程,直到体力不支或被其他健康对虾攻击和吞食。感染期的红额角对虾表皮上皮,特别是腹部背板接合处经常出现白色或浅黄色的斑点(此种斑点的形状及出现部位不同于对虾白斑综合征的特征白斑),使对虾看上去体色斑驳。继而这种斑点会逐渐消褪。同时,感染了 IHHNV 的红额角对虾和斑节对虾在濒死时体色常偏蓝,腹部肌肉不透明。南美白对虾感染 IHHNV 后表现为慢性矮小残缺综合症(runt-deformity syndrome, RDS),主要影响是患病对虾生长缓慢,表皮畸形,但死亡率很低。据报道养殖的红额角对虾和斑节对虾也会患慢性矮小残缺综合症。稚虾或大一些的南美白对虾患慢性矮小残缺综合症的严重程度及流行与幼体或仔虾阶段的早期感染有关。患病稚虾表现额角弯曲、变形,触角鞭毛皱起,表皮粗糙或缺。患 RDS 的稚虾大小差异很大,且一般比正常的对虾短小。南美白对虾和红额角对虾的稚虾如没有感染 IHHNV 且没表现 RDS,其患 RDS 的种群变异系数 CV 等于标准偏差与一个种群内不同组别大小的平均数的比值,通常只有 10%~30%,而感染患病的对虾 CV 通常大于 30%,有时甚至会接近 90%。斑节对虾感染后,通常症状不明显,但引起 RDS,造成生长缓慢和生产性能下降。IHHNV 可影响南美白对虾的各个生长期(如卵、幼体、仔虾、稚虾和成虾)。

IHHNV 已确定至少有四个不同的基因型。一是美洲和东亚(主要是菲律宾),二是东南亚,三是东非,四是西印度-太平洋。前两个基因型可以感染代表性的对虾南美白对虾和斑节对虾,而后两个变异的基因型也许并不会感染这些对虾品种。其中 392F/R 和 389F/R 两对引物是检测包括 3A 型和 3B 型在内的西太平洋、东非、澳大利亚和印度所有 IHHNV 已知病毒型的最合适引物。309F/R 只扩增 IHHNV 的 I 型和 II 型(IHHNV 感染型)一段目的片断。而 MG831F/R 引物可以扩增 3A 型和 3B 型非感染型片断。



**附录 B**  
(资料性附录)  
**IHHNV PCR 目的片段序列**

**B.1 389F 和 389R 引物扩增产物序列(大小 389 bp)**

1	cggaacacaa	cccgaacttta	ttgaagggac	tccaacgga	ccggacgaaa	tggacggaag
61	gcgactggaa	gagagtgaga	ttgataaaca	agtggaaaagt	acaacatggt	acaccttcgt
121	catcagagaa	aaaccacaac	caagaagact	ctccggacga	acgccaaact	tcaccattac
181	agatcatggt	gaccaactggc	acatcacata	ctccggacac	ccaaccaata	agaccagaca
241	tagagctaca	atcctcgctt	atttgggagt	tacctttgct	gccagagccg	aagctgaagc
301	gactacggta	cttgtagaa	atatcaagag	atggatactc	tatcttatca	gatacggtat
361	tgaacggctt	tcgtattttg	gtcttggcc			

**B.2 392F 和 392 R 引物扩增产物序列(大小 392 bp)**

1	gggcgaacca	gaatcaactta	gtgaattgct	tcgagaacgc	acgaacgaaa	ctcactccag
61	ccagggaatt	tetccaagcc	ttctcacccc	aggtccaaat	caagacccta	aaccactac
121	cgaacaactt	cttaatatgt	ctgaagaact	gttcagttt	tcagacgagg	aagacaactc
181	tcaaactcct	ccaagaactt	caacaccaga	acaaactgatc	ctaaggctctg	cgtggataac
241	ctgggaattc	gagagggaac	aggaaacgga	acaattcaac	ttggaagtga	atcagaaacc
301	tcccttgga	gtgttgga	cagtaatgac	aggggtaaaa	agagacagag	aggaattact
361	tacatcagt	acacatcag	attcctcgg	at		

**B.3 77012F 和 77353R 引物扩增产物序列(大小 356 bp)**

1	atcgggtcac	tactcgga	actgaacact	ggcctagtaa	caagaacagg	agactcaaac
61	acctccatc	tacaaaacct	catcggaag	tctacgctc	tcttcgaaga	accagaatc
121	agtcaaataa	cagtggacga	cttcaaactc	cttttcgaag	gatcagactt	agaagtaa
181	ataaaacacc	aagagtcaga	aattatggga	cgaataccaa	tcttcata	aacaaacaaa
241	gatgtggact	actgggtace	tccagctgat	ggtaaagctc	tacaaacaag	aacaaaaacc
301	ttccacctga	caagcaaat	aaaaggctc	tcagacagga	tgaacagcca	gtacga

**B.4 309F 和 309R 引物扩增产物序列(大小 309 bp)**

1	tccaacactt	agtcaaaacc	aaatctgcaa	gaacagtcca	agaacttgct	aataaacttg
61	acgatgagga	atacaaacag	ctatggaccc	gcaccagagg	acaatataaa	gacaaactca
121	ggggaatact	aacttactac	aacaacaaga	aaaagtcaaa	caaagccaa	ctgtcactca
181	ttacaaacct	gcaaaatata	tcaaaaagga	aaccagacta	cgacaacatg	cagtggataa
241	agtacatgtt	agccaacaac	gacatccgtg	taccagaaat	cttagcttgg	ataatcatcg
301	tagcagaca					



B.5 MG831F 和 MG831R 引物扩增产物序列(大小 831 bp)

1	ttggggatgc	agcaatatct	ccataaacca	tgttcaggac	aacttaacaa	atgttatgtt
61	atgcatacta	actaatatac	ttaatctgtg	caatatgtaa	ccaactataa	cctgctttat
121	accaataaaa	acccacaaaa	agcaaataa	tctcactatc	ctttacacaa	accggctacc
181	caggcatggt	gggaaacctg	ctacccaggc	aaggtgggac	aataatctca	taatgagaaa
241	ataagtcagt	catataagtc	attcacaaag	gactcgtaac	tccaccgtca	gtcagtcact
301	taaactcagg	gatattgtcc	accgtcattt	agagcgcgaa	gcgcgagtat	ccatcattta
361	aactggcgtg	atgacgtcac	atattaaagt	gacggctctt	gcgaagacta	agggaggagg
421	agtgtgccc	tgggttcgcc	acggcagtct	ctgaccgatt	ctcaaaacca	gcaacctgac
481	ggatccagtt	gctctgtgag	agtccttcaa	gcgcgtaaca	ctcgaagcag	ctcaggaggt
541	ggatccagtt	gctctgtgag	agtccttcaa	gcgcgtaaca	ctcgaagcag	ctcaggaggt
601	ctgaagcgtg	tcgcaaggct	cggctgaatg	ggaatcaagt	cttgcgtcgt	tccatgggtgc
661	gtagggctcg	gacactgctg	agaagggaca	aggaacagtt	catcaggaat	cttgctgact
781	ctgagcccta	agccctctc	acagatgact	gcagtccgat	cagtggatgg	ac

附 录 C  
(规范性附录)  
试 剂 配 制

**C.1 10%柠檬酸盐溶液**

柠檬酸钠 10 g 加入到蒸馏水中,充分溶解,定容到 100 mL。

**C.2 蛋白酶 K 裂解液(10 mg/mL)**

将 100 mg 蛋白酶 K 溶解于 10 mL 灭菌蒸馏水中,分装后贮存于-20℃待用。

**C.3 CTAB 溶液**

称取 8.19 g NaCl、0.744 g EDTA、1.12 g Tris-HCl,加入约 60 mL DEPC 处理过的超纯水中,搅拌充分溶解,加入约 0.3 mL 浓盐酸,调节 pH 至 7.5~8.0 加入 2 g CTAB 搅拌充分溶解,然后定容到 100 mL,搅拌均匀后,分装待用。使用前加巯基乙醇到终浓度为 0.25%。

**C.4 TBE 电泳缓冲液(5 倍浓缩液)**

Tris 碱	54.0 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g
定容至	1 000 mL

用 5.0 mol/L 的 HCl 调 pH 为 8.0。

**C.5 TN 缓冲液**

Tris 碱	2.42 g
NaCl	23.38 g
双蒸水	1 000 mL

调 pH 到 7.4,高压灭菌后 4℃保存。

**C.6 10×TE(Tris EDTA)**

100 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0)

10 mmol/L EDTA(pH 8.0)

分装后高压灭菌,室温保存。

10 mg/mL 鲑鱼精子 DNA

鲑鱼精子 DNA(salmon sperm DNA)	0.25 g
----------------------------	--------

双蒸水	定容至 25 mL
-----	-----------

将 DNA 缓慢加入水中,加热并搅拌使之完全溶解;高压灭菌。分装于无菌离心管中,-20℃保存。

**C.7 20×SSC**

NaCl	175.32 g
柠檬酸三钠(2H <sub>2</sub> O)	88.23 g
双蒸水	定容至 1 000 mL



调 pH 为 7.0, 高压灭菌后 4 ℃ 保存。

#### C.8 预杂交液(50 mL 终体积)

Blocking Reagent II	10 mg
5×SSC	1 mL
20%十二烷基肌氨酸钠	15 μL
10%SDS	2 mL
在 60 ℃~80 ℃ 水浴中间歇晃动 5 min~10 min, 完全溶解。	

#### C.9 2×SSC/0.1%SDS

20×SSC	10 mL
10%SDS	1 mL
加双蒸水定容至	100 mL

#### C.10 0.1×SSC/0.1%SDS

20×SSC	0.5 mL
10%SDS	1 mL
加双蒸水定容至	100 mL

#### C.11 10×缓冲液 I

Tris/HCl	121.1 g
NaCl	87.7 g
双蒸水	定容至 1 000 mL
用浓盐酸调 pH 7.5, 高压灭菌, 4 ℃ 保存。	

#### C.12 缓冲液 II

封闭剂 II	0.25 g
缓冲液 I	50 mL 1×Buffer I
在 60 ℃~80 ℃ 水浴中间歇晃动 5 min~10 min, 完全溶解。	

#### C.13 1×缓冲液 III

100 mmol/L Tris/HCl	1.21 g
100 mmol/L NaCl	0.58 g
双蒸水	定容至 100 mL
用浓盐酸调 pH 9.5, 加 1.02 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 滤膜过滤, 4 ℃ 保存。	

#### C.14 显色液 I

1×缓冲液 III	90 mL
75 mg/mL NBT 溶液	4.5 μL
50 mg/mL BCIP 溶液	3.5 μL
4 ℃ 保存。	

#### C.15 缓冲液 IV

10 mmol/L Tris/HCl	1.21 g
--------------------	--------



1 mmol/L EDTA 0.37 g  
用浓盐酸调 pH 8.0, 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 4  $^{\circ}$ C 保存。

#### C. 16 Davidson's AFA 固定液

95%乙醇	330 mL
37%甲醛	220 mL
冰乙酸	115 mL
双蒸水	335 mL

#### C. 17 500 $\mu$ g/mL 多聚赖氨酸包被液

多聚赖氨酸(相对分子质量大于 150 000)	5 mg
双蒸水	10 mL

溶解后, 4  $^{\circ}$ C 保存, 1 周内用完。

#### C. 18 10 $\times$ PBS

NaCl	160 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	23 g
KCl	4 g
双蒸水	定容至 2 000 mL

用 NaOH 调制 pH 至 8.2, 高压灭菌后室温保存。

#### C. 19 100 $\mu$ g/mL 蛋白酶 K(临用前配制)

PBS	10 mL 1 $\times$ PBS
蛋白酶 K	1 mg

#### C. 20 杂交缓冲液

20 $\times$ SSC	10 mL
100%甲酰胺	25 mL
20 $\times$ Denhardt's 溶液	2.5 mL
25%硫酸葡聚糖	10 mL

加热到 60  $^{\circ}$ C, 溶解。

2.5 mL 的 10 mg/mL。鲑鱼精子 DNA 煮沸 10 min, 加入预杂交液使终浓度达到 0.5 mg/mL, 4  $^{\circ}$ C 保存。

20 $\times$ Denhardt's 溶液	
牛血清白蛋白 BSA(组分 5)	0.4 g
水溶性聚蔗糖 400	0.4 g
聚乙烯吡咯烷酮 360(PVP 360)	0.4 g
双蒸水	定容至 100 mL

0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 4  $^{\circ}$ C 保存。2.5 mL 小分装, 冰冻保存。

25%硫酸葡聚糖	
硫酸葡聚糖(Dextran sulfate)	25 g
双蒸水	定容至 100 mL



低热搅拌使之溶解,分装,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

#### C.21 显色液 II

缓冲液 III 90 mL

10%PVA 10 mL

$4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。用前在每 1 mL 以上混合液中加入  $4.5\text{ }\mu\text{L}$  NBT 和  $3.5\text{ }\mu\text{L}$  BCIP。

#### C.22 0.5%俾斯麦棕-Y 溶液

俾斯麦棕-Y 2.5 g

双蒸水 定容至 500 mL

把染料溶于水中,用 Whatman I 号滤纸过滤,室温保存。

---



中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
传染性皮下和造血器官坏死  
检疫技术规范

SN/T 1673—2013

\*

中国标准出版社出版  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)  
总编室:(010)64275823

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 34 千字  
2014年2月第一版 2014年2月第一次印刷  
印数 1—1 600

\*

书号: 155066 • 2-26552 定价 21.00 元



SN/T 1673-2013