



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1151.5—2014
代替 SN/T 1151.5—2003

对虾杆状病毒病检疫技术规范

Quarantine protocol for tetrahedral baculovirosis

2014-11-19 发布

2015-05-01 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

SN/T 1151 分为 6 部分：

- 虾桃拉综合征检疫技术规范；
- 对虾白斑病检疫技术规范；
- 斑节对虾杆状病毒(MBV)诊断方法；
- 虾黄头病检疫技术规范；
- 对虾杆状病毒病检疫技术规范；
- 对虾白斑病毒斑点杂交和原位杂交检测操作规程。

本部分为 SN/T 1151 的第 5 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 SN/T 1151.5—2003《对虾杆状病毒(BP)检测方法》。

本部分与 SN/T 1151.5—2003 相比,主要技术变化如下：

- 增加了采样；
- 对 PCR 试验引物进行了修改；
- 增加了扩增产物的参考序列。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：史秀杰、何俊强、蒋玉婷、王津津、于力、郑晓聪、贾鹏、兰文升、杨锦舜、刘荭。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- SN/T 1151.5—2003。

对虾杆状病毒病检疫技术规范

1 范围

SN/T 1151 的本标准规定了对虾杆状病毒的显微镜检查、聚合酶链式反应检测方法。
本标准适用于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

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 试剂和材料

3.1 水:符合 GB/T 6682 一级水的规格。

3.2 *Taq* DNA 聚合酶:—20℃保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。

3.3 dNTPs:含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L。

3.4 引物:一对引物,浓度为 40 μmol/L,序列为:

6581F:5'-TGT-AGC-AGC-AGA-GAA-GAG-3'

6582R:5'-CAC-TAA-GCC-TAT-CTC-CAG-3'

扩增病毒基因中的 645 bp 的 DNA 片断。

3.5 无水乙醇:分析纯,使用前预冷到—20℃。

4 仪器和设备

4.1 剪刀和镊子。

4.2 载玻片和盖玻片。

4.3 恒温培养箱。

4.4 普通冰箱和超低温冰箱。

4.5 正置显微镜。

4.6 离心机和离心管。

4.7 微量移液器及吸头。

4.8 PCR 扩增仪。

4.9 电泳仪。

4.10 紫外观察灯或凝胶成像仪。

5 采样

虾卵、幼虾、仔虾取整个作为样品,稚虾、成虾(鲜活的、濒死的或有损伤的)取肝胰腺、肠或粪便作为样品。根据 GB/T 18088 规定的数量取样。用于分子生物学检测的样品可以是新鲜的、冰冻的、90%乙醇保存的,或其他适用于 DNA 扩增的保存样品。

6 对虾杆状病毒的诊断

6.1 实验室环境

病原鉴定的实验室环境条件应符合 GB 19489 的要求。

6.2 直接光学显微镜检查

6.2.1 新鲜组织湿片法

取活的(鲜活的、濒死的或有损伤的)对虾肝胰腺和中肠,置于载玻片上,小心地制备压片,用相差或亮视野显微镜检查包涵体。

6.2.2 粪便检查法

该方法适用于稚虾或大一些的对虾,尤其适用于用非致死方法检查有经济价值的亲虾是否带有 BP。把对虾放在水簇箱、产卵箱或其他合适的水箱中,待数小时直到水箱底部出现粪便。用塑料虹吸管吸取排泄物,放在玻璃离心管中。把粪便制成湿片,用相差或亮视野显微镜检查包涵体。

6.2.3 结果判定

在肝胰腺、中肠或粪便的湿压片中,如果观察到上皮细胞的核内有单个或多个四面体的包涵体,可确认为对虾杆状病毒(Baculovirus penaei, BP)感染。

6.3 聚合酶链式反应(PCR)检测

6.3.1 提取 DNA

6.3.1.1 将粪便、肝胰腺、中肠或待检样本匀浆后,加入 10 倍体积的蛋白酶 K 消化液(见 A.1),混合振荡使样品在缓冲液中分散。60℃加热 1 h,然后 95℃处理 10 min。12 000 r/min 离心 2 min,将上清转移到新的离心管中,然后置于冰上备用。

6.3.1.2 吸取 200 μ L 消化后的样品,加入 600 μ L 样品稀释液(见 A.2),加 600 μ L 酚/三氯甲烷/异戊醇(见 A.4),充分混合 30 s;12 000 r/min 离心 5 min,取上层水相(约 700 μ L);加 650 μ L 三氯甲烷/异戊醇(见 A.3),用力混合 30 s;12 000 r/min 离心 5 min,取上层水相(约 600 μ L);加 1.5 倍体积-20℃预冷的无水乙醇,混匀后-20℃过夜以沉淀核酸(在不能及时进行 PCR 检测的情况下,可置于 1.5 倍体积无水乙醇中,长期保存);15 000 r/min 离心 30 min,小心弃上清,立即用滤纸吸干(应尽量充分吸干),37℃干燥约 30 min;加 11 μ L 水溶解,吹打 20 下,-80℃冻融一次,做 PCR 模板。

6.3.1.3 可使用同等抽提效果的其他方法或使用商品化试剂盒抽提病毒 DNA。

6.3.2 PCR 扩增

用 PCR 检测 BP 时,每个抽提样品要煮沸 3 min,使 DNA 变性,然后放在冰上迅速冷却。PCR 反

应混合物总体积 25 μL : 10 倍 PCR 缓冲液 2.5 μL 、25 mmol/L MgCl_2 1.5 μL 、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL 、40 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.5 μL 、5 U *Taq* 酶 0.5 μL 、待测样品 DNA 模板 1 μL ，加水到 25 μL 。混匀后稍离心，再将反应管置于 PCR 扩增仪。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

6.3.3 设立对照

在 6.3.2 中设立阳性对照、阴性对照、空白对照。取已知的感染了对虾杆状病毒的对虾组织(由指定单位提供)和未感染对虾杆状病毒的对虾组织,用 6.3.1 中的方法制备 PCR 模板,分别设立阳性对照和阴性对照;用 1 μL 水作为 PCR 模板,设立空白对照。

6.3.4 琼脂糖电泳

用 TBE 缓冲液(见 A.5)配制 1.5% 的琼脂糖(含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EB)板,约 0.5 cm 厚。将平板放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将 6 μL PCR 扩增产物和 2 μL 上样缓冲液(见 A.6)混匀后加入样品孔。30 mA 电泳约 0.5 h,当溴酚蓝到达底部时停止。在电泳时设立 DNA 标准分子量 Marker 作对照。用紫外灯或凝胶成像仪观察核酸带。

6.3.5 结果判定

PCR 后阳性对照出现 645 bp 大小的扩增条带,阴性对照和空白对照没有该扩增条带。待测样品 PCR 后在相应的位置上有扩增条带,可确认为对虾杆状病毒。无扩增带或扩增带的位置不对的为阴性。

如果阴性对照出现扩增条带和(或)阳性对照未出现预期大小的扩增条带,本次测试样品的结果无效,需重新进行试验。

6.4 综合判定

在肝胰腺、中肠或粪便的湿压片中,观察到上皮细胞的核内有单个或多个四面体的包涵体,同时 PCR 检测 BP 结果也为阳性的,可确诊为对虾杆状病毒病。

附 录 A
(规范性附录)
试 剂 配 制

A.1 蛋白酶 K 消化液

氯化钾(KCl)	50 mmol/L
Tris-HCl	10 mmol/L pH 8.3
明胶	0.1 mg/mL
Nonidet P-40	0.45 %
吐温-20(Tween-20)	0.45 %
蛋白酶 K	80 μ g/mL

A.2 样品稀释液

Tris-HCl	10 mmol/L pH 8.0
EDTA	0.1 mmol/L

A.3 三氯甲烷/异戊醇

将二者按 24 : 1 的比例混合,密闭避光保存。

A.4 酚/三氯甲烷/异戊醇

用 1 mol/L Tris 饱和酚,三氯甲烷/异戊醇等体积混合,密闭避光保存。

A.5 TBE 电泳缓冲液(5 倍浓缩液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g
水	1 000.0 mL

用 5.0 mol/L 的盐酸调 pH 到 8.0。

A.6 上样缓冲液

每 100.0 mL 溶液中:溴酚蓝 0.25 g,蔗糖 40.0 g。

附 录 B
(资料性附录)
扩增产物的参考序列

1 tgtagcagca gagaagagag aagagagaaa taagtgaagt aaataaaatg
51 tcgggagctg aacatatgga aggtgttgag cgagtgtctca gggatttgaa
101 cagtgaagaa aaattaacac tcggactgag tgctgtgggt ggggtagttg
151 gggcaactaa gatgatgaat gaagctgcag agcttagaag gaattatgga
201 aatcgcccat atgaaaggct tttggagttg agcaagagaa agtatgagtc
251 cacaccaaca tcaggatttg aggagcgagt aagaccatct atggtgaac
301 agctagatag aagcacaag aggccaagga aagctaacag gtccacagta
351 aacactcatt ataacatgca taagatctgc aagaggacaa acctgacctc
401 ctccaaactt ttaggtttt ctggtcaggc tggaccagat gtccaaaat
451 ataacagtgc agtaacccta ccattggagg ctctagaatt ttgggtggga
501 gataacataa atccagaagt agcacactcc atgggaagca aagtattgag
551 cgataaggaa tgcagggtaa aatcaatgaa actgaaactt agcaacctgc
601 aagtatatga agacagacaa tatggatctg gagataggct tagtg

附 录 C
(资料性附录)
对虾杆状病毒病

对虾杆状病毒病又名四面体杆状病毒病(Tetrahedral baculovirosis),是由对虾杆状病毒(Baculovirus penaei,BP),又名南美白对虾单核型多角体病毒(PvSNPV)引起的。该病毒暂被列在核型多角体病毒属,目前已发现至少存在三个地域的病毒株,分别分布在东南大西洋、美国墨西哥沿岸及加勒比海,南美、中美和北美洲的太平洋沿岸,夏威夷。该病毒通过肠道感染肝胰腺小管及中肠前段粘膜上皮细胞,在上皮细胞核内产生单个或多个四面体包涵体。包涵体呈四面体或金字塔状,金字塔底部到顶部高0.1 μm到20 μm,垂直长度大多为8 μm,有些文献把BP包涵体归为PIBs(多面体包涵体)。

BP主要在美洲和夏威夷流行,感染野生对虾,在东半球野生或养殖对虾中并未发现BP。鉴于BP在水产养殖业中造成的较大危害,OIE将其列入水生动物疫病检疫名录中,中国将其列为《中华人民共和国进境动物一、二类传染病、寄生虫病名录》二类疫病。该病毒宿主广泛,可感染对虾属(*Penaeus*)的滨对虾亚属(*Litopenaeus*)、美对虾亚属(*Farfantepenaeus*)、明对虾亚属(*Melicertus*)、沟对虾亚属(*Fenneropenaeus*)、对虾亚属(*Penaeus*),鹰爪虾属(*Trachypenaeus*)和原糙对虾属(*Protrachypene*)等在内的所有对虾品种。BP发病率差异很大,以幼体、仔虾和稚虾早期阶段对病毒最为敏感,从野生和养殖群体的不足1%,到对虾育苗池的100%。实验室攻毒试验显示,幼体(尤其是蚤状幼体和糠虾幼体)和仔虾早期阶段最容易感染BP,也是对虾孵化场中死亡率可能最高的两个阶段。稚虾或成虾感染BP后,死亡率一般不高,但在虾场中,感染可能导致虾生长缓慢、对虾育苗池或养成池中虾的成活率降低。严重感染了BP的蚤状幼体,糠虾幼体和早期仔体,出现发白的中肠(由于在粪便中出现包涵体和细胞碎片),稚虾、成虾以及轻度感染的幼虾没有呈现具诊断价值的症状。除严重感染的后期幼体表现出昏睡外,没有受感染宿主出现行为变化的报道。

BP主要是水平传播,通过摄食感染的组织(同类残食)、粪便、包涵体或病毒污染的碎屑或水体引起。一般在对虾宿主存在持续感染,严重感染BP的野生雌性南美白对虾的成体在产卵时会排泄出含BP的粪便,从而污染了虾卵,把病毒传给下一代。可以通过消毒剂、降低pH值、加热和紫外照射等方法灭活病毒。在孵化场中可以使用福尔马林、有机碘和干净的海水彻底清洗无节幼体或虾卵,以消除粪便对虾卵和幼体的污染。对已感染或可能感染病毒的亲虾虾卵进行日常消毒,可以减少BP流行病在孵化场的发生。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
对虾杆状病毒病检疫技术规范
SN/T 1151.5—2014

*

中国标准出版社出版
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)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

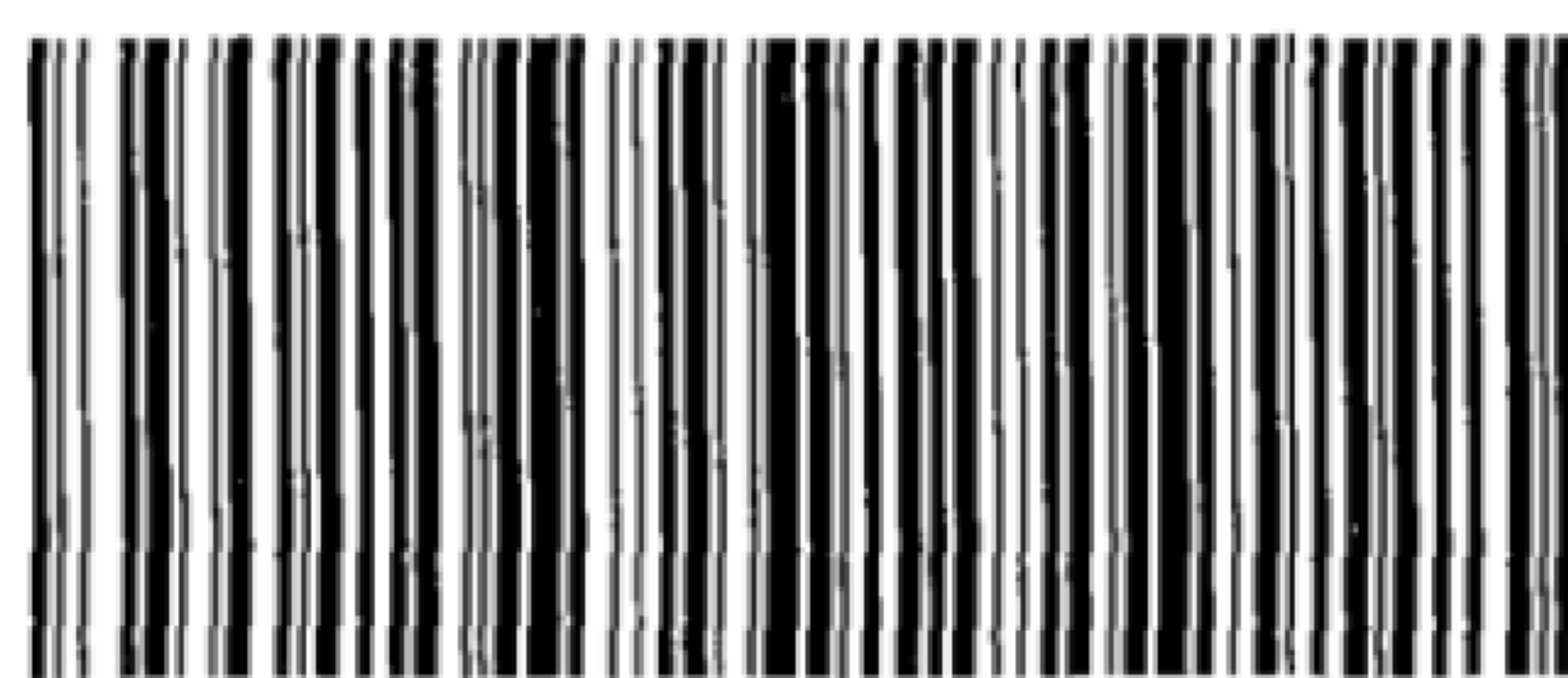
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2015 年 12 月第一版 2015 年 12 月第一次印刷
印数 1—1 100

*

书号: 155066·2-29349 定价 16.00 元



SN/T 1151.5—2014