



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3492—2013

传染性肌肉坏死检疫技术规范

Quarantine protocol for infectious myonecrosis

2013-03-01 发布

2013-09-16 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准参考了 OIE《水生动物疾病诊断手册(2011 年版)》第 2.2.3 章,选取 OIE 手册中临床诊断内容和分子诊断中关于反转录-聚合酶链式反应和实时荧光定量反转录-聚合酶链式反应检测方法的内容。

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、中华人民共和国湖南出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:兰文升、郑晓聪、史秀杰、黄继徽、唐连飞、贾鹏、王津津、叶奕优、王红英。

传染性肌肉坏死检疫技术规范

1 范围

本标准规定了传染性肌肉坏死病毒(Infectious myonecrosis virus, IMNV)的反转录-聚合酶链式反应和实时荧光定量反转录-聚合酶链式反应的检测方法。

本标准适用于具有临床症状的传染性肌肉坏死(Infectious myonecrosis, IMN)的检疫和诊断。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

反转录-聚合酶链式反应 reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR

RNA 在逆转录酶的作用下,在适宜反应条件下,被逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行聚合酶链式反应。

3.2

实时荧光定量反转录-聚合酶链式反应 real-time RT-PCR

在常规 RT-PCR 的基础上,加入一条特异性的荧光探针,荧光 PCR 仪器的监测系统可以接收到 PCR 反应中的荧光信号,每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,使荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

3.3

Ct 值 cycle threshold

Real-time RT-PCR 每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

4 主要试剂和材料

4.1 除特别说明外,本标准仅使用确认为分析纯的试剂。

4.2 水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.3 *Taq* 酶: -20 ℃ 保存。

4.4 反转录酶: -20 ℃ 保存。

4.5 RNase 抑制剂: -20 ℃ 保存。

4.6 T7 RNA 聚合酶: -20 ℃ 保存。

4.7 DNase I: -20 ℃ 保存。

- 4.8 pGEM-T Easy Vector: -20 °C 保存。
- 4.9 PstI 限制性内切酶: -20 °C 保存。
- 4.10 NTP: 含 CTP、GTP、ATP、TTP 各 2.5 mmol/L 的混合物, -20 °C 保存。
- 4.11 dNTP: 含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L 的混合物, -20 °C 保存。

4.12 引物

浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, -20 °C 保存, 其序列如下:

正义引物(IMNV218F): 5'-GCT GGA CTG TAT TGG TTG AG-3';
反义引物(IMNV682R): 5'-AAC CAA GTT CTT CTT CTC CAG TT-3';
正义引物(4587F): 5'-CGA CGC TGC TAA CCA TAC AA-3';
反义引物(4914R): 5'-ACT CGG CTG TTC GAT CAA GT-3';
正义引物(4725NF): 5'-GGC ACA TGC TCA GAG ACA-3';
反义引物(4863NR): 5'-AGC GCT GAG TCC AGT CTT G-3';
正义引物(IMNV412F): 5'-GGA CCT ATC ATA CAT AGC GTT TGC A-3';
反义引物(IMNV545R): 5'-AAC CCA TAT CTA TTG TCG CTG GAT-3';
探针(IMNVp1):
5'-6FAM-CCA CCT TTA CTT TCA ATA CTA CAT CAT CCC CGG-TAMRA-3';

引物用无 RNA 酶的去离子水配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的储备液, 在使用过程中根据需要配制不同工作浓度。

- 4.13 病毒 RNA 抽提试剂盒或其他抽提 RNA 的等效产品。
- 4.14 溴化乙锭(EB)。
- 4.15 溴酚蓝 DNA 上样液(见附录 A)。
- 4.16 TAE 电泳缓冲液(见附录 A)。
- 4.17 核酸分子量标准参照物。

5 器材和设备

- 5.1 PCR 扩增仪。
- 5.2 实时荧光定量 PCR 仪器(7 500 Real Time PCR System 或其他等效设备)。
- 5.3 电泳仪(0 V~3 V)和水平电泳槽。
- 5.4 微量移液器和微量移液器吸头。
- 5.5 凝胶成像仪。
- 5.6 恒温培养箱。
- 5.7 普通冰箱和低温冰箱。
- 5.8 匀浆器。
- 5.9 台式高速离心机和离心管。
- 5.10 制冰机。
- 5.11 电泳仪。

6 临床症状的诊断

6.1 行为变化

出现环境胁迫时, 严重感染的虾表现为游动缓慢, 持续进食; 将虾体解剖, 发现此时病虾的胃肠一般

充满食物。

6.2 发病症状

急性发病期虾样的骨骼肌呈现点状或者片状坏死区域,尤其是尾部腹节和尾肢,病灶区肌肉发白及不透明症状。显微镜观察,肌肉组织出现浮肿和淋巴器官中血细胞纤维化,在坏死的肌纤维和纤维化的血细胞之间有液体堆积,并常伴有深色包涵体。

7 取样和样品处理

7.1 样品的运输与保存

按照 GB/T 18088 采样,样品至少应在 4℃ 以下的环境中运输,实验室接收样品后应该尽快检测,如果暂时不能检测,应该将样品置于 -80℃ 冰箱中保存。

7.2 取样

样品尽可能取后期幼体和成虫期虾样,取样器官是对虾条纹肌、结缔组织或血细胞(参见附录 B),可以把不超过 5 头的样本混合做混样。取每只虾的肌肉组织 20 mg~50 mg,合计 100 mg~250 mg 样品,研磨均匀待用。

7.3 制样

将取好样品混合均匀后,再取 20 mg~50 mg 加入适量 RNA 抽提试剂盒中的裂解液,15℃ 下,用匀浆器将 1.5 mL 离心管中样品均浆成糊状,取 140 μL 制备样品,同步制备已知感染 IMNV 和已知未感染 IMNV 的虾样分别作为阳性和阴性对照,然后,用病毒 RNA 抽提试剂盒抽提病毒 RNA(提取步骤参照试剂盒操作手册)。如果无法获得已知阳性样品,用第 7 章的方法制备 RNA 阳性对照物用来代替阳性样品抽提的核酸。

7.4 RNA 样本的保存

制备的 RNA 样本应尽快进行 RT-PCR 或 real-time RT-PCR,如果暂时不能进行下一步反应,应该将样本置于 -80℃ 保存备用,保存期不超过 1 周。

8 RNA 阳性对照物的构建

8.1 用 RT-PCR 从 IMNV 基因组扩增 DNA 片段

选用如下引物 IMNV218F 和 IMNV682R 从阳性样本制备的 RNA 中用 RT-PCR 方法(RT-PCR 方法参见 9.2)扩增 464 bp 的 DNA 片段,克隆至 pGEM-T Easy Vector 载体,并转化大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 细胞,然后按照质粒抽提试剂盒的方法抽提质粒。

8.2 RNA 阳性对照物的制备

将上一步得到的重组质粒用 *Pst*I 酶切使之线性化,作为 T7RNA 聚合酶的转录模板,37℃ 条件下,1 μg 质粒在 20 μL 反应体系作用 2 h(反应体系参见表 1)。转录产物然后用 DNaseI 在 37℃ 酶切 30 min(反应体系参见表 2),然后加入 2.5 μL 0.5 mol/L EDTA,混匀,80℃ 加热处理 2 min,热处理灭活 DNaseI,即得到合成的 RNA 对照物,置于 -80℃ 冰箱备用,可以作为后续 RT-PCR 和 Real-Time RT-PCR 检测方法的阳性参考标准。

SN/T 3492—2013

表 1 20 μL 反应体系的转录反应的反应体系组成

反应试剂	加样体积
10 \times T7 RNA 聚合酶 Buffer	2 μL
T7 RNA 聚合酶(10 U/ μL ~50 U/ μL)	1 μL
二硫苏糖醇 DTT (50 mmol/L)	2 μL
NTP 混合物(各 2.5 mmol/L)	4 μL
RNA 酶抑制剂(40 U/ μL)	0.5 μL
模板 DNA(50 ng~500 ng)	5 μL
无 RNA 酸 双蒸水	5.5 μL
总体积	20 μL

表 2 50 μL 反应体系的 DNase I 酶切反应的反应体系组成

反应试剂	加样体积
10 \times DNase I Buffer	5 μL
DNase I(无 RNA 酶, 5 U/ μL)	2 μL
RNA 酶抑制剂(40 U/ μL)	1 μL
转录产物(50 ng~500 ng)模板	20 μL
无 RNA 酶 双蒸水	22 μL
总体积	50 μL

9 嵌套式 RT-PCR 检测 IMNV 的核酸

9.1 设立对照

9.1.1 在 7.3 中的样品处理过程中应当设立阳性样品对照、阴性样品对照、空白对照。

9.1.2 取含有已知含 IMNV 的病毒组织抽提的核酸或制备的 RNA 阳性对照物核酸作为阳性对照(参见 8.2)。

9.1.3 取已知未含 IMNV 的对虾组织抽提核酸作为阴性对照。

9.1.4 取等体积的水代替模板作为空白对照。

9.2 RT-PCR 扩增

9.2.1 反应体系

反应体系按总体积 50 μL 和反应试剂以一步法试剂盒为例,各试剂浓度比例如表 3 所示。

注: PCR 反应体系可选择 25 μL 、50 μL 或 100 μL 反应体系进行,各组分按比例增加或减少。

表 3 50 μL 反应体系的 RT-PCR 反应所需试剂组成

反应试剂	加样体积	试剂终浓度
10 \times One Step RNA PCR Buffer	5 μL	1 \times
MgCl ₂ (25 mmol/L)	10 μL	5 mmol/L
dNTP 混合物(各 10 mmol/L)	5 μL	各 1 mmol/L
RNA 酶抑制剂(40 U/ μL)	1 μL	0.8 U/ μL
AMV RTase XL (5 U/ μL)	1 μL	0.1 U/ μL
AMV-Optimized Taq(5 U/ μL)	1 μL	0.1 U/ μL
4587F Primer(20 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL	0.4 $\mu\text{mol/L}$
4914R Primer(20 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL	0.4 $\mu\text{mol/L}$
抽提 RNA 样本	1 μL	1/50
无 RNA 酶 双蒸水	24 μL	—
总体积	50 μL	—

9.2.2 反应条件

双链 RNA 解链:100 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; RT-PCR:50 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 反转录酶灭活:95 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; PCR 反应:95 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 29 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min; 扩增片段长 328 bp。

注:可使用其他等效的一步法或者两步法 RT-PCR 检测试剂盒,反应体系组分浓度和反应条件可以根据试剂生产商推荐的条件做相应调整。

9.3 嵌套式-PCR 扩增

9.3.1 反应体系

PCR 反应体系可选择 25 μL 、50 μL 或 100 μL 反应体系进行,各组分按比例增加和减少,反应体系按总体积 50 μL 为例,各试剂浓度比例如表 4。

表 4 50 μL 反应体系的嵌套式-PCR 反应所需试剂组成

反应试剂	加样体积	试剂终浓度
RT-PCR 产物	1 μL	1/50
10 \times PCR Buffer	5 μL	1 \times
dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L)	4 μL	0.2 mmol/L
MgCl ₂ (25 mmol/L)	10 μL	5 mmol/L
引物 4725 NF(20 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL	0.4 $\mu\text{mol/L}$
引物 4863NR (20 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL	0.4 $\mu\text{mol/L}$
Taq(5 U/ μL)	1 μL	0.1 U/ μL
双蒸水	27 μL	—
总体积	50 μL	—

SN/T 3492—2013

9.3.2 反应条件

95℃,2 min;95℃,30 s,65℃,30 s,72℃,30 s,39 个循环;72℃,7 min;扩增片段长 139 bp。

注：可使用其他等效的 PCR 检测试剂盒，反应体系组分浓度和反应条件可以做相应调整。

9.4 琼脂糖电泳

用 TAE(见附录 A)电泳缓冲液配制 1.5%的琼脂糖(含 1 μg/mL EB)平板。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 样品和溴酚蓝指示剂溶液按比例混匀后加入样品孔。在电泳时使用核酸分子量标准参照物作对照。5 V/cm 电泳约 0.5 h,当溴酚蓝到达底部时停止。

9.5 结果判定

9.5.1 在紫外灯下观察核酸带并判断结果。

9.5.2 第一次 PCR 产物电泳后,如果阴性对照和空白对照未出现条带,并且阳性对照出现预期大小为 328 bp 扩增条带,待检样品也出现一条约 328 bp 的 DNA 片段,则判断样品 IMNV RT-PCR 反应阳性,对获得的序列进行测序分析(参见附录 C 的 C.1),确证 IMNV 检测阳性。如果待检样品未出现预期大小的扩增条带,则做第二轮嵌套式-PCR。

9.5.3 第二轮 PCR 产物电泳后,如果阴性对照和空白对照未出现条带,待检样品如果出现约 139 bp 大小的条带,并且阳性对照出现预期大小为 139 bp 大小的扩增条带,则判断待检样品 IMNV 嵌套式-PCR 反应阳性,对获得的序列进行测序分析(参见附录 C 的 C.1),确证 IMNV 检测阳性。如果待检样品未出现预期大小的扩增条带,则判断 IMNV 阴性。

10 Real-Time RT-PCR 检测 IMNV 的核酸

10.1 在 7.3 中的样品处理过程中必须设立阳性样品对照、阴性样品对照、空白对照。

10.1.1 取含有已知含 IMNV 的病毒组织抽提的核酸或制备的 RNA 阳性对照物核酸作为阳性对照(参见 8.2)。

10.1.2 取已知未含 IMNV 的对虾组织抽提核酸作为阴性对照。

10.1.3 取等体积的水代替模板作为空白对照。

10.2 Real-Time RT-PCR 的运行

10.2.1 反应体系

Real-timeRT-PCR 反应体系可选择 10 μL、25 μL 或 50 μL 反应体系进行,各组分按比例增加或减少,反应体系按总体积 25 μL 为例,各试剂浓度比例如表 5。

表 5 25 μL 反应体系的 Real-time RT-PCR 反应所需试剂组成

反 应 试 剂	加 样 体 积
One Step RT-PCR 缓冲液Ⅲ(2×)	12.5 μL
PrimeScript RT enzyme mix Ⅱ	0.5 μL
TaKaRa Ex Taq HS(5 U/μL)	0.5 μL
引物 IMNV412F(10 μmol/L)	1 μL
引物 IMNV545R(10 μmol/L)	1 μL

表 5 (续)

反 应 试 剂	加 样 体 积
Taq Man 探针 IMNVp1(10 μmol/L)	0.5 μL
无 RNA 酶的双蒸水	7 μL
RNA 模板	2 μL
总体积	25 μL

10.2.2 反应条件

双链 RNA 解链,100 ℃,5 min;48 ℃反应 30 min,95 ℃反应 10 min;95 ℃反应 15 s,600 ℃反应 1 min,40 个循环,用基因扩增仪 Gene Amp 7 500¹⁾ 分析 PCR 反应结果。

10.3 结果判定

- 10.3.1 待检样品的 Ct 值≥38 时,则判断 IMNV 核酸检测阴性。
- 10.3.2 待检样品的 Ct 值≤35 时,则判断 Real-Time RT-PCR 反应阳性。
- 10.3.3 待检样品的 Ct 值介于 35 和 38 之间时,应该重新进行检测。如果重新检测 Ct 值≥38 时,则判断 Real-Time RT-PCR 反应阴性,直接确证 IMNV 检测阴性。如果重新检测的 Ct 值介于 35 和 38 之间时,则判断 Real-Time RT-PCR 反应阳性。

11 结果的综合判定

具有临床症状的虾样品判定为 IMN 可疑,可疑样品经过 RT-PCR 或者 Real-time RT-PCR 反应为阳性,则可确诊该虾样品为 IMN 阳性,否则判为 IMN 阴性。

1) 所给的信息是为方便标准使用者,并不表示对该产品的认可,如果其他等效产品具有相同的效果,可使用这些等效产品。

附 录 A
(规范性附录)
所用试剂及配制

A.1 TAE 电泳缓冲液(50 倍储存液)

Tris	242.0 g
冰醋酸	57.1 mL
EDTA	37.2 g
水	定容至 1 000 mL

A.2 溴酚蓝 DNA 上样液

溴酚蓝	0.25 g
蔗糖	40 g
水	定容至 100 mL

A.3 实验所涉及到的引物和探针可由经过验证具有同等检测效果的公司合成,涉及到的限制性内切酶和 DNA 聚合酶也可购自经过验证具有同等检测效果的公司。

A.4 样品的病毒核酸抽提试剂盒可购自具有同等效果的商业公司。

附 录 B

(资料性附录)

传染性肌肉坏死概述

传染性肌肉坏死是由传染性肌肉坏死病毒(Infectious myonecrosis virus, IMNV)造成的病毒性疾病,主要宿主是凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)、细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、东南褐虾(*Farfante penaeussubtilis*),均可感染传染性肌肉坏死病毒。环境胁迫行为如捕捞、投食以及水域盐分和温度的突然改变等可造成由传染性肌肉坏死病毒引起的对虾高死亡率,从疫区引进的稚虾、幼虾和成虾易发病,严重染病的虾遇到外界胁迫攻击前可以不断进食直至消化道满食。发病虾的临床症状表现为:停食,反应迟钝,聚集在池塘的角落,体色发白;病虾腹节发红,尾部肌肉组织呈点状或扩散的坏死,开始在腹节末梢和尾扇,移去腹节的表皮,感染处可见白色或不透明的白色组织,严重感染的虾不断死亡,这种死亡状态可以维持数天。虽然传染性肌肉坏死病毒可以感染对虾的所有生活阶段,但是卵和幼虫期病毒量较低,这些阶段不适合取样检测,最适合的取样时机是后期幼体和成虫期。传染性肌肉坏死病毒主要感染中胚层起源的组织,在急性感染期,感染对虾条纹肌、结缔组织和血细胞。在慢性感染期,淋巴器官是主要的靶器官,因此,血细胞或者腹肢可以作为取样器官。

传染性肌肉坏死病毒属整体病毒科(Totiviridae)的成员,病毒颗粒是二十面体,直径 40 nm,病毒是一种无囊膜双链 RNA 病毒,基因组长度 7 560 bp,包括 2 个开放阅读框(ORF1、ORF2),其中 ORF1 编码一个 RNA 结合蛋白和一个衣壳蛋白,ORF2 编码一个由 736 个氨基酸组成的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase)。无论 RT-PCR 还是 Real-time RT-PCR 方法,OIE 推荐引物位置均在 ORF1 基因上(GenBank ID:AY570982),PCR 扩增反应具有很高的特异性。

附 录 C
(资料性附录)
引物

C.1 嵌套式-PCR 引物位置

ACTCGACGCT GCTAACCATA CAAAACCTTT TGCTATTGAA GGAGGAAGAC TCGTATATTT
4587F
GGGTGGAACA ATTGCAAATA CAACCAATGT GGTAACGCA ATGCAGAGGA AACAAAGGCT
TTCAAAACCG GCATTCAAGT GGGCACATGC TCAGAGACAA CGTGTATATG ACAGCAGTCG
4725 NF
TCCAGGGATG GACGCAATCA CAAAGTTGTG TGCACGAAAG TCGGGTTTTA TGAATGCCCG
TTCCACAGCA ATGATGGCAC CCAAGACTGG ACTCAGCGCT GTTATAGATC AAGCACCAA
4863 NR
TACATCTCAA GACTTGATCG AACAGCCGAG TCAGCAAGAG
4914R

C.2 Real-time RT-PCR 引物位置

GGACCTATCA TACATAGCGT TGCATTTGCA AGAACTGGTT CAGTATGGAC ACCTGCCACC
IMNV412F
TTTACTTTCA ATACTACATC ATCCCCGGGT AGACTGCAAG TACAAATGTC ATCCAGCGAC
IMNV545R
AATAGATATG GGTT
