ICS 65.020.30
B 41

SC

中华人民共和国水产行业标准

SC/T 7202.2—2007

斑节对虾杆状病毒病诊断规程 第2部分：PCR检测法

Diagnostic Protocols for *Penaeus monodon*-Type Baculovirus (MBV) of Penaeid Shrimp— Part 2: PCR Method

2007-06-14 发布　　2007-09-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前　言

SC/T 7202《斑节对虾杆状病毒病诊断规程》分为三个部分：
——第1部分：压片显微镜检查法；
——第2部分：PCR检测法；
——第3部分：组织病理学诊断法。
本部分为SC/T 7202的第2部分。
本部分的附录A和附录B为规范性附录，附录C为资料性附录。
本部分由中华人民共和国农业部渔业局提出。
本部分由全国水产标准化技术委员会归口。
本部分起草单位：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。
本部分主要起草人：黄倢、杨冰、陈爱平、宋晓玲、史成银、杨丛海、魏琦。

斑节对虾杆状病毒病诊断规程
第2部分:PCR检测法

1 警告—使用本标准的人员应有正规实验室工作的实践经验,本标准并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施,并保证符合国家有关法规规定的条件。

2 范围

SC/T 7202的本部分规定了斑节对虾杆状病毒病PCR检测法的原理、试剂与材料、仪器设备、操作步骤和结果判定。

本部分适用于进行病原筛查和疾病的确诊。其中核型多角体基因保守序列法仅适用于对虾,包括对虾活体、粪便,以及冰冻和冰鲜虾产品的MBV的筛查和疾病的初步诊断。单独使用时不适于对病毒量或感染活性的估测以及宿主感染程度的评估。

3 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

SC/T 7202.1—2007 斑节对虾杆状病毒病诊断规程 第1部分:压片显微镜检查法

SC/T 7202.3—2007 斑节对虾杆状病毒病诊断规程 第3部分:组织病理学诊断法

4 原理

4.1 斑节对虾杆状病毒病的病原和病理学特征

见SC/T 7202.3—2007(斑节对虾杆状病毒病诊断规程 第3部分:组织病理学诊断法)中3.1的规定。

4.2 技术原理

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)是以待测样品的一段DNA作为模板,以与模板两端序列互补的一对特异性寡核苷酸序列作为引物,在四种脱氧核糖核苷三磷酸存在下,利用依赖DNA的DNA聚合酶的合成作用。经过数十次变性、退火和延伸的反应循环,使模板上介于两个引物之间的DNA片段得到特异性地级数扩增,再通过电泳等手段检测到被特异性扩增的片段,从而可揭示微量病毒DNA的存在。套式PCR是在第一步PCR扩增的产物内,再用一对引物进行第二步PCR扩增。

5 试剂和材料

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。

5.3 液体石蜡。

5.4 含氯消毒剂:医用品或水产药物。

5.5 琼脂糖:电泳级。

5.6 1 kb DNA分子量标准:生化试剂。

5.7 10×PCR 缓冲液:生化试剂,随 TaqDNA 聚合酶提供,-20℃保存。

5.8 $MgCl_2$(25 mmol/L):生化试剂,-20℃保存。

5.9 dNTP(10 mmol/L):生化试剂,含 dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 各 10 mmol/L 的混合物,-2℃保存。

5.10 TaqDNA 聚合酶(5U/μL):生化试剂,-20℃保存。

5.11 10 μmol/L 引物 F1:5'-ACY-TAY-GTG-TCA-GAC-AAC-AAA-TAY-TAC-AAA-3',序列含有简并碱基,其中:Y=T 或 C,用于杆状病毒多角体基因保守序列法,-20℃保存。

5.12 10 μmol/L 引物 R1:5'-GGY-GCG-TCK-GGY-GCA-AAY-TTY-TTW-ACY-TTR-AA-3',序列含有简并碱基,其中:Y=T 或 C,K=T 或 G,W=A 或 T,R=A 或 G,用于杆状病毒多角体基因保守序列法,-20℃保存。

5.13 TE 缓冲液按附录 A 的规定执行。

5.14 抽提缓冲液按附录 A 的规定执行。

5.15 10 mol/L 乙酸铵按附录 A 的规定执行。

5.16 平衡酚按附录 A 规定执行。

5.17 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)按附录 A 的规定执行。

5.18 1×电泳缓冲液按附录 A 的规定执行。

5.19 6×载样缓冲液按附录 A 的规定执行。

5.20 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)贮存液按附录 A 的规定执行。

5.21 70%乙醇按附录 A 的规定执行。

5.22 阳性对照为已知 MBV 阳性的组织或粪便样品的 DNA 模板,-20℃保存。

5.23 阴性对照为已知 MBV 阴性的组织或粪便样品的 DNA 模板,-20℃保存。

5.24 空白对照以无菌双蒸水为模板。

6 仪器设备

6.1 PCR 仪。

6.2 电泳仪:输出直流电压 0 V~600 V。

6.3 水平电泳槽:50 mL~500 mL,带有 5 cm~20 cm 宽度的凝胶船及相应的样孔梳。

6.4 紫外观察仪:可遮挡可见光干扰,在 230 nm~300 nm 波长对凝胶发射紫外线,推荐带照相机架。

6.5 台式高速离心机:转速 12 000 r/min 以上。

6.6 手掌型离心机:塑料转头,转速 2 000 r/min~4 000 r/min。

6.7 水浴锅。

6.8 普通冰箱:具冷藏箱,并带-18℃以下冷冻箱体。

6.9 微量移液器:量程 0.5 μL~10 μL、5 μL~40 μL、40 μL~200 μL、200 μL~1 000 μL。

6.10 电炉或微波炉等其他加热设备。

6.11 医用剪刀。

6.12 医用镊子。

6.13 三角烧瓶:容量 100 mL~250 mL。

6.14 玻璃研磨棒或塑料研磨棒:用于在 1.5 mL 塑料离心管中研磨样品。

6.15 1.5 mL 塑料微量离心管:经高压蒸汽灭菌,一次性使用。

6.16 灭菌 0.2 mL PCR 管:经高压蒸汽灭菌,一次性使用。

6.17 微量移液器枪头:经高压蒸汽灭菌,一次性使用。

6.18 塑料或乳胶手套。

6.19 吸水纸。

7 操作步骤

7.1 杆状病毒多角体基因保守序列法

7.1.1 反应体系的准备

7.1.1.1 PCR 反应可选择 25 μL、50 μL 或 100 μL 反应体系进行。

7.1.1.2 在 PCR 前区按表 1 的要求,加入除 Taq 酶以外的各项试剂,配制成无酶反应预混物。按 10 份/支或 100 份/支分装,保存于 −20℃。在临用前,根据所需的反应份数,取出无酶反应预混物,加入相应体积的 Taq 酶,混匀,即成完全的反应预混物。按 1 份/支分装到 0.2 mL PCR 管中。如果 PCR 仪不具备热盖功能,再向各管内加入 50 μL 液体石蜡。暂存于 4℃。

表 1 100 份 PCR 反应预混物所需试剂组成

试剂	25 μL 体系	50 μL 体系	100 μL 体系	试剂终浓度
10×PCR 缓冲液	250 μL	500 μL	1 000 μL	1×
$MgCl_2$(25 mmol/L)	200 μL	400 μL	800μL	2.0 mmol/L
dNTP(10 mmol/L)	50μL	100 μL	200μL	200 μmol/L
引物 F1(10 μmol/L)	37.5 μL	75 μL	150 μL	0.15 μmol/L
引物 R1(10 μmol/L)	37.5 μL	75 μL	150 μL	0.15 μmol/L
灭菌双蒸水	1 815 μL	3 630 μL	7 260 μL	—
TaqDNA 聚合酶(5U/μL)	10 μL	20 μL	40 μL	0.02 U/μL
100 份反应总体积	2 400 μL	4 800 μL	9 600 μL	
注:25 μL 体系模板量 1 μL/反应管;50 μL 体系模板量 2 μL/反应管;100 μL 体系模板量 4 μL/反应管。				

7.1.2 样品准备

7.1.2.1 样品采集的要求按 SC/T 7202.1—2007(斑节对虾杆状病毒病诊断规程 第 1 部分:压片显微镜检查法)附录 B 的规定执行。

7.1.2.2 活体或冰冻幼体、仔虾个体样品约 5 mg～100mg(去掉幼虾眼);活体或冰冻幼虾或成虾肝胰腺或粪便样品 5 mg～100 mg。上述待检样品放入灭菌 1.5 mL 塑料微量离心管中。

7.1.2.3 必须避免各样品间的交叉污染。所有非一次性使用的样品处理工具要经清洗,然后浸于新配制的有效氯含量为 3.0×10^{-3}的含氯消毒剂中 5 min,经无 PCR 产物污染的自来水充分清洗,再经蒸馏水淋洗后方可用于下一个样品。

7.1.3 DNA 的提取

7.1.3.1 样品 DNA 的提取应在样品区完成。

7.1.3.2 在样品剪碎后加入抽提缓冲液 500μL,用研磨棒充分研磨,37℃温浴 1 h。

7.1.3.3 加入 2.5 μL20 mg/mL 蛋白酶 K,至终浓度 100 μg/mL,混匀后置于 50℃水浴 3 h,不时旋动。

7.1.3.4 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。

7.1.3.5 水相移至新塑料微量离心管中,加入等体积酚/氯仿/异戊醇,颠倒混合 10 min,于 10 000 r/rmin 离心 1min 分离两相。

7.1.3.6 水相移至一新灭菌微型离心管中，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。

7.1.3.7 水相移至一新灭菌微型离心管中，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℃)混匀，－20℃放置 2 h。10 000 r/min 离心 10 min，弃上清液。

7.1.3.8 用 70%乙醇洗涤沉淀 2 次，每次 10 000 r/min 离心 5 min，小心倾去上清液，最后沉淀于室温晾干。

7.1.3.9 沉淀晾干后加入 100 μL 灭菌双蒸水溶解 DNA。

7.1.3.10 若 DNA 样品需要保存，建议溶解于 100 μLTE 缓冲液中并保存于－20℃。

7.1.4 **PCR 扩增**

7.1.4.1 在 PCR 前区，按照表 1 对各反应体系所需的模板体积要求，向各支含有 1 份反应预混物的 PCR 管帽上，分别加入相应体积的各样品的 DNA 提取液。并设阳性对照、阴性对照和空白对照。

7.1.4.2 将上述加有样品模板的 PCR 管带入 PCR 后区，置于已预热到 94℃的 PCR 仪中保温 5 min，逐只依次快速取出并在手掌型离心机上短暂离心 1 s～2 s，使管盖上的样品模板混入反应预混物中，再立即放回预热的 PCR 仪中，继续在 94℃保温 5 min，再按以下程序进行扩增：95℃1 min、45℃1 min、72℃1 min，35 个循环；72℃5 min，最后 4℃保温。准备进行产物的电泳。

7.1.5 **琼脂糖凝胶的制作**

7.1.5.1 在电泳区用 1×电泳缓冲液配制 1.5%的琼脂糖凝胶，建议于三角烧瓶中配制，在电炉上或微波炉中加热至溶液完全透明(为避免煮沸时液体外溢，胶液体积应少于容器体积的 1/4)。待溶液冷却至 60℃左右，加入 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)(有毒)至终浓度 0.5 μg/mL，摇匀。

7.1.5.2 将凝胶液缓缓倒入设置好样孔梳和防漏条/套的水平放置的凝胶船，胶液厚度 0.6 cm～0.8 cm。样孔梳底部水平深入凝胶层约 0.3 cm～0.5 cm，并距凝胶底部 0.2 cm，以免穿透。

7.1.5.3 待凝胶完全凝固后，小心拔掉样孔梳，去掉防漏条/套，即可用于电泳。

7.1.6 **电泳**

7.1.6.1 将制备好的琼脂糖凝胶连同凝胶船一起装入水平电泳槽，加样孔应朝向负极，加入 1×电泳缓冲液至没过胶面约 1 mm～2 mm 的深度。

7.1.6.2 将 10μL PCR 反应产物与 2 μL6×载样缓冲液混匀后加入到加样孔中。同时至少设一个泳道加入 5μL 1kb DNA 分子量标准的载样混合物。

7.1.6.3 盖上电泳槽并通电，使 DNA 由阴极向阳极移动。在 1 V/cm～5 V/cm 的电压下电泳约 1 h，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，将疑胶置于紫外观察仪上观察或照相。

7.1.7 **分子量计算**

7.1.7.1 测定分子量标准的每条区带到加样孔的迁移距离(即泳动率)，将各区带分子量的对数值对其泳动率作图，各点的排列应该接近是一条下降的直线，画出其趋势线，求出分子量计算的回归方程。

7.1.7.2 测量各样品泳道出现的条带的泳动率，利用分子量标准所得出的分子量计算的回归方程，计算各条带的泳动率。

7.1.7.3 由于凝胶在电泳时，其中的温度和电场的不均一性，以及电泳时所加样品的离子强度或 DNA 浓度的差异，相同分子量的 DNA 片段在凝胶中的泳动率会有所差异，各条带分子量的实际测量的结果允许有 1%～3%的误差。

7.1.8 **后处理**

观察完毕的凝胶和污染有 PCR 产物或 EB 的一次性用品和溶液，应立即按附录 B 的规定处理。

8 结果判定

8.1 核型多角体基因保守序列法中阳性对照在674碱基对(bp)处会有一条特定条带出现:阳性样品在674 bp处会有特定条带出现;阴性对照和阴性样品在674 bp处应无条带出现,空白对照不出现任何条带。阳性对照在674 bp处无特定条带出现或阴性对照在674 bp处有条带出现都表明PCR失败,应在排除故障和清除污染后,重新取样检测。斑节对虾杆状病毒病PCR检测产物序列参见附录C。

8.2 条带的亮暗表示扩增产物浓度的多少,但并不对应于模板的量的多少。

8.3 阳性结果表明被检样品中存在MBV DNA。对活虾和敏感宿主而言,提示已受MBV感染;对冰鲜对虾而言,提示曾受到MBV感染。

8.4 电泳结果的分析和问题排除方法参见表2。

表2 电泳结果分析

实验结果	结果判读及原因分析	问题排除
对虾样品 核型多角体基因保守序列法中阳性对照和阳性样品在674 bp处有条带,阴性对照和空白对照无674 bp条带	1.PCR反应正常,结果有效	
阴性对照有条带,但分子量标准没有影像	1.分子量标准失效或加样量太少	更换分子量标准或增加其加样量
分子量标准有影像,但阳性对照无条带	1.PCR反应失败 2.阳性对照失效	检查并更换PCR反应所用试剂以及PCR程序是否正确 更换阳性对照,重新实验
核型多角体基因保守序列法中阴性对照或空白对照在674bp处有条带出现	1.微量移液器污染 2.试剂污染 3.环境污染 4.操作污染	清洗微量移液器,只能用PCR后区的微量移液器跑电泳 更换试剂 清洁实验室及所用仪器设备,见附录B 禁止从PCR后区到PCR前区的交流,加强操作隔离
阳性对照和阴性对照组正常,但已知带毒样品无条带	1.DNA提取失败或降解 2.DNA不纯或DNA浓度过高 3.PCR抑制物介入	检查提取DNA所用试剂情况,重新实验,确认样品新鲜程度 用OD_{260}/OD_{280}比值来确定。其正常比值应在1.6~1.8之间,若低于1.6则表示蛋白质过多 重新提取DNA
分子量标准正常,但阳性对照、阴性对照和样品出现较多杂带或明显的弥散区	1.未注意热启动操作,使PCR出现非特异性扩增 2.酶活性、dNTP浓度或Mg^{2+}浓度差异 3.温度控制异常	做好热启动操作。样品先要加到PCR管盖上,反应预混物预热后,短暂离心(1 s~2 s)以混入样品,迅速放回预热PCR仪中 确认预混物制备的准确性、试剂质量,对不同批次的酶重新测定最佳Mg^{2+}离子浓度 检查PCR仪是否复性温度过低

表 2（续）

实验结果	结果判读及原因分析	问题排除
凝胶上无任何影像，包括 DNA 分子量标准	1. 紫外观察仪故障 2. 背景发红太亮 3. 凝胶太厚 4. 电极颠倒或电泳时间过长 5. EB 分解失效	检查紫外观察仪 减少 EB[a] 用量，将琼脂糖凝胶置于清水中 30 min 后再观察结果 重新制作琼脂糖凝胶片 改正电极方向，重新加样电泳 重新配制溴化乙锭(EB)
a 溴化乙锭(EB)有毒，试剂的操作和废弃物的处理按附录 B 的规定执行。		

附 录 A
（规范性附录）
试 剂 配 方

A.1 1 mol/LTris·HCl(pH 8.0)

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/LHCl 调整 pH 至 8.0。

加水定容至	1 000 mL

分装后，高压蒸汽灭菌，室温贮存。

A.2 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)

乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na_2·$2H_2O$)	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。

高压蒸汽灭菌，室温贮存。

A.3 TE 缓冲液(pH 8.0)

1 mol/LTris·HCl(pH 8.0)	10 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	2 mL
加水定容至	1 000 mL

高压蒸汽灭菌，4℃贮存。

A.4 1 mg/mL 胰 RNA 酶

胰 RNA 酶	10 mg
TE 缓冲液(pH 8.0)	10 mL

溶解后，于 100℃加热 15 min，缓慢冷却至室温，分装 100μL/管，－20℃贮存。

A.5 10%SDS

SDS(十二烷基硫酸钠)	10 g
水	90 mL

加热至 68℃助溶，加入几滴浓盐酸调节溶液的 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/LTris·HCl(pH 8.0)	1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	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

溶解后分装于无菌离心管中(0.25 mL/管),-20℃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℃贮存。

A.9 平衡酚

推荐直接购买市售的平衡酚。若无市售平衡酚可用,采用以下方法制备。

将苯酚晶体于 68℃融化,用空气冷凝管蒸馏器进行重蒸馏,收集 160℃的馏份于三角烧瓶中。冷却后,加入 8-羟基喹啉至终浓度为 0.1%,用 0.5 mol/LTris·HCl(pH 8.0)抽提一次,再用 0.1 mol/L Tris·HCl(pH 8.0)抽提数次,每次抽提用磁力搅拌器搅拌 15 min,然后静置 30 min 分层,尽可能完全地抽出上层水相。水相的 pH 大于 7.8 后即达到平衡,置棕色玻璃瓶中,上面覆盖 0.1 体积含 0.2%β-巯基乙醇的 0.1 mol/LTris·HCl(pH 8.0)液层,4℃贮存,一个月内使用。

注:酚腐蚀性很强,并可引起严重灼伤,操作时应戴手套和防护镜,穿防护服。所有操作均应在化学通风橱内进行。与酚接触过的皮肤应立即用大量水冲洗,并用肥皂和水洗涤,忌用乙醇。

A.10 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)

平衡酚	50 mL
氯仿	48 mL
异戊醇	2 mL
0.01 mol/L Tris·HCl(pH 8.0)	100 mL

混匀后,自然分层。置于棕色瓶内,4℃贮存,1 个月内使用。

A.11 50×电泳缓冲液

Tris	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	100 mL
加水定容至	1 000 mL

室温贮存。

A.12 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.13 6×载样缓冲液

蔗糖	40 g
加水溶解,定容至	100 mL
溴酚蓝	0.25 g

溶解后,4℃贮存。

A.14 0.5 mol/L $KMnO_4$

$KMnO_4$	79 g
加水溶解,定容至	1 000 mL

室温贮存。

A.15 2.5 mol/L HCl

在 500 mL 水中加入浓 HCl(37%HCl)	246.35 mL
混匀并冷却后,加水定容至	1 000 mL

室温贮存。

A.16 2.5 mol/L NaOH

NaOH	100 g
加水 700 mL 溶解,冷却后定容至	1 000 mL

置于聚丙烯塑料瓶中,旋紧瓶盖,室温贮存。

A.17 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)贮存液

溴化乙锭(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。

溴化乙锭是强诱变剂并有中度毒性,称量时应戴面罩和手套,避免溅洒,试剂瓶应注明,使用时应戴手套,参见附录 B。

A.18 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。

附 录 B
（规范性附录）
PCR 实验室要求和化学药品及仪器设备操作安全注意事项

B.1 PCR 实验室分区

PCR 前和 PCR 及 PCR 后的工作范围必须分区成为相互隔离的实验室，所需试剂、仪器、实验室各种用品、工作服等均应独立使用。长期从事常规性 PCR 检测工作的人员也应进行专门分工。

专用于进行套式 PCR 检测的实验室应分为四个隔离的区域（房间），包括洁净区、样品区、扩增区和电泳区。洁净区和样品区属于 PCR 前区，扩增区和电泳区属于 PCR 后区。其中洁净区专用于配制和分装 PCR 所用试剂，不应该接触任何样品；样品区专用于进行样品的处理和第一步 PCR 的加样，不应该接触任何 PCR 产物；扩增区专用于进行 PCR 循环和第二步 PCR 的加样，不应该暴露第二步 PCR 产物，由于暴露第一步 PCR 产物也可能造成严重污染，必须对扩增区经常进行产物污染的消除处理；电泳区专用于 PCR 产物的检测。只允许从洁净区→样品区→扩增区→电泳区的单向物流，同时 PCR 后区应该尽可能避免各步 PCR 产物的污染。

应定期对专门从事 PCR 的实验室各区的产物污染程度进行测试评估，并有针对性地进行消除产物污染的处理。

B.2 含 PCR 反应产物的材料

PCR 反应产物的不当处理会造成实验室的严重污染，含 PCR 反应产物的用品，如枪头、离心管、凝胶和手套等必须用 3.0×10^{-3}浓度的含氯消毒剂溶液处理后，再以塑料袋密封包装后丢弃，含有 PCR 反应产物的溶液必须加入含氯消毒剂达 3.0×10^{-3}的浓度，经处理 10 min 以上后方可直接倒入下水道口。可能沾污 PCR 反应产物的衣物、桌椅、拖把、扫帚、垃圾桶等严禁带入 PCR 前区。需保存的 PCR 产物只能密封保存在 PCR 后区。

B.3 溴化乙锭

溴化乙锭为致癌物，有中度毒性，可通过皮肤或黏膜吸收，对环境有污染，需要按照以下方法来进行操作或处理。

（1）溴化乙锭浓溶液的净化处理

加入足量的水使溴化乙锭的浓度降低至 0.5 mg/mL 以下。加入 1 倍体积的 0.5 mol/L$KMnO_4$，小心混匀后再加 1 倍体积的 2.5 mol/LHCl。小心混匀，于室温放置数小时。加入 1 倍体积的 2.5 mol/LNaOH，小心混匀后可丢弃该溶液。

0.5 mol/L$KMnO_4$、2.5 mol/LHCl、2.5 mol/LNaOH 按附录 A 的规定。

（2）溴化乙锭稀溶液的净化处理

每 100 mL 溶液中加入 100 mg 粉状活性炭。于室温放置 1 h，不时摇动。用 Whatman1 号滤纸过滤溶液，丢弃滤液。用塑料袋封装滤纸和活性炭，作为有害废物处理。

（3）溴化乙锭固体的操作

应避免吸入或食入溴化乙锭的固体或粉尘。操作人员要穿戴实验服及手套，如果不慎沾到皮肤，立即用大量清水冲洗。

B.4 酚、氯仿等有毒害有机溶剂

有强腐蚀性，操作时要穿戴实验服及手套，应避免吸入或食入。直接的皮肤接触应立即用大量清水冲洗。

B.5 电泳

电泳时会产生 100 V～600 V 的直流电压，同时电极处会产生大量的微小气泡。应盖好电泳槽上盖以避免气泡炸裂导致 PCR 产物的污染和有毒试剂的挥发。避免接触电极及液面以防触电。

B.6 紫外线

长时间暴露于紫外线下会对眼睛及皮肤造成严重伤害，因此在使用紫外观察仪时必须穿上实验服、护目镜及防护面罩。

附 录 C
（资料性附录）
斑节对虾杆状病毒病 PCR 检测产物序列

1 ACTTATGTGT CAGACAACAA ATATTACAAA AACTTGGGGG GTCTCATCAA AAACGCCAAA
F1
61 CGCAAGAAGC ACCTAATCGA ACAAGAAAAA GAGGAGAAAC AATGGGCTCT TCTAGACCTC
121 GACATAGTCG CAGAGGATCC GTTCATGGGT CCTGGTAAAA ATCAAGAAGT TACTCTGTTC
181 AAAGAGATTC GTAACGTGAA GCCCGACCCG ATGAAGCTGA CTGTCAATTG GAACGGTAAA
241 GAGTTTCTGC GCGAGACTTG GACTCGTTTT ATGGAGGACA GCTTCCCCAT CGTAAACGTA
301 CAAGAGTGTA TGGACGTGTT TAGTGTCAAA ATATGCAGTC CCACTAGACC GAACCGTTGC
361 TTTGAATTTT TAGCAGGCCT GATGCGAAGG TGGGAGATGG TTCACTACGG TCCCCACGAA
421 CTGATCAGAA TGATGAACCG CTCGTACGTC GGCACCAATA ACGAATACAA CAGTCTGGCT
481 AACAAGGGCG GCGGTTGTCC CCGTAATAAC TTGCACCCCG ATAACAACAC GTCGTTCGAA
541 TCATTCGCAA ATATGGCAAT TTGAACAGCG TCATCTGTAC GTGGGCACTA CCTCGGCACC
601 GACTATGCCG AAGAAGAAAT TCTAATTGAA GTTTCTCTCG TTTTCAAAAT AAAAGAGTTT
R1
661 GCACCAGACG CGCC