ICS 65.020.30
B 41

SC

中华人民共和国水产行业标准

SC/T 7203.1—2007

对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第1部分：PCR检测法

Diagnostic Protocols for Hepatopancreatic Parvovirus Disease of Penaeid Shrimp—Part 1: 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 7203《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程》分为三个部分：

——第1部分：PCR检测法；

——第2部分：组织病理学诊断法；

——第3部分：新鲜组织的T-E染色法。

本部分为SC/T 7203的第1部分。

本部分的附录A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。

对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程
第1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 7203的本部分规定了对虾肝胰腺细小病毒病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。

本部分适用于对虾活体、冰鲜虾产品及其粪便和敏感宿主等样品中肝胰腺细小病毒(hepatopancreatic Parvovirus,HPV)带毒情况的定性检测。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 7202.2—2007 斑节对虾杆状病毒病诊断规程 第2部分:PCR检测法

SC/T 7203.2—2007 对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第2部分:组织病理学诊断法

4 原理

4.1 对虾肝胰腺细小病毒病的病原和病理学特征

见SC/T 7203.2—2007(对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第2部分:组织病理学诊断法)中3.1的规定。

4.2 技术原理

按照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)中4.2的规定。

5 试剂和材料

5.1 所需试剂除引物、阳性对照和阴性对照以外按照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)中第5章的规定。

5.2 10 μmol/L引物F1:5'-GGT-GAT-GTG-GAG-GAG-AGA-3',-20℃保存。

5.3 10 μmol/L引物R1:5'-GTA-ACT-ATC-GCC-GCC-AAC-3',-20℃保存。

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

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

6 仪器和设备

所需仪器设备按照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)中第6章的规定。

7 操作步骤

7.1 反应体系的准备

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

7.1.2 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 mLPCR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(无Mg^{2+})	250 μL	500 μL	1 000 μL	1×
$MgCl_2$(25 mmol/L)	400 μL	800 μL	1 600 μL	4.0 mmol/L
dNTP(10 mmol/L)	50 μL	100 μL	200 μL	200 μmol/L
10 μmol/L引物F1	250 μL	500 μL	1 000 μL	1 μmol/L
10 μmol/L引物R1	250 μL	500 μL	1 000 μL	1 μmol/L
灭菌双蒸水	1 175 μL	2 350 μL	4 700 μL	—
Taq DNA聚合酶(5 U/μL)	25 μL	50 μL	100 μL	0.05 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。				

7.2 样品准备

按照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)中7.1.2的规定执行。

7.3 DNA的提取

按照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)中7.1.3的规定执行。

7.4 PCR扩增

7.4.1 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，分别加入相应体积的样品DNA提取液。并设阳性对照、阴性对照和空白对照。

7.4.2 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：94℃1 min、60℃1 min、72℃1 min，40个循环；72℃延伸7 min，最后4℃保温。准备进行产物的电泳。

7.5 PCR产物电泳

按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)中7.1.5～7.1.8的规定执行。

8 结果判定

8.1 阳性对照在628碱基对(bp)处会有一条特定条带出现；阳性样品在628 bp处会有特定条带出现；阴性对照和阴性样品在628 bp处应无条带出现，空白对照不出现任何条带。阳性对照在628bp处无特

定条带出现或阴性对照在628 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。对虾肝胰腺细小病毒病PCR检测产物序列参见附录A。

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HPV DNA。对活虾和敏感宿主而言，提示已受HPV感染；对冰鲜或冰冻对虾而言，提示曾受到HPV感染。

8.4 电泳结果的分析和问题排除方法见表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 阳性对照和阳性样品在628 bp处有条带，阴性对照和空白对照无628 bp条带	1.PCR反应正常，结果有效	
阳性对照有条带，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	检查并更换PCR反应所用试剂以及PCR程序是否正确
	2.阳性对照失效	更换阳性对照，重新实验
阴性对照或空白对照在628 bp处有条带出现	1.微量移液器污染	清洗微量移液器，只能用PCR后区的微量移液器取反应产物
	2.试剂污染	更换试剂
	3.环境污染	清洁实验室及所用仪器设备见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）附录B
	4.操作污染	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	检查提取DNA所用试剂情况，重新实验，确认样品新鲜程度
	2.DNA浓度过高	将样品稀释10倍以上
	3.PCR抑制物介入	稀释样品10倍以上，或重新提取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	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
	2.酶活性、dNTP浓度或Mg^{2+}浓度差异	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
	3.温度控制异常	检查PCR仪是否复性温度过低
凝胶上无任何影像，包括DNA分子量标准	1.紫外观察仪故障	检查紫外观察仪
	2.背景发红太亮	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
	3.凝胶太厚	重新制作琼脂糖凝胶片
	4.电极颠倒或电泳时间过长	改正电极方向，重新加样电泳
	5.溴化乙锭（EB）分解失效	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）附录B的规定执行。

附 录 A
（资料性附录）
对虾肝胰腺细小病毒病 PCR 检测产物序列

1 TCCGACTCGA GGGGGTGATG TGGAGGAGAG AATGTAACAA TGCCTATGAA GTATAAAGAA

F1

61 CACAAGACTC ATATGTTCAG GAAGCCTGTA TTTTTGACTA ATCAGCATCA CCCATTGGTA

121 GACATATCAC ATTATGATGA CAGAAGAGCT ATAGAGAATA GAAGTTTCAT GTATAAAGTA

181 GAGTTAGGAA AGGAACCAGT AAATGCACAT ATAAAGTTTC CTAATAGGAT GATTCCAATC

241 AAGAAGAACC AGAACTAACG CAGTTTGTAT TGGCCAGCAT GCAGTATGTT CATACAAACT

301 ATATGAACAG ACCAGACAAG AAGTTTAAAA TTGGATTTTT CAACAAGCTT TATGACGCGC

361 TGTTTGAGAA CAGCTAAAAC TATGTACGCA GGGTTCAAGT TTTCCCGGCA TAAATAAAGT

421 GATAAGATAA GATTGAGAGT TTGAATATCC ACGTCACACA CAAAGGTAGT ATACCATGAG

481 TCTAGTATGG GAGCAGTCGT ATCTGCAGTT GCTGCAGTAA TAGCTGTAGT AGTCGAAGTC

541 TCGAGTTCAT AGTCGATGTC GTGGAAGTGG CTTTCGTGGT GGCAGAAACT GTACAGGTCG

601 TTGCAGACAC AGTCGATTAC TTTGTTGGCG GCGATAGTTA CTGCGCCAGA ACGATCAGAG

R1

661 CAATCCGAAG ACGGAGGGAG CTAACGAAAT TAACGACAGA ACGACATC