

斑节对虾杆状病毒 (MBV) 嵌套 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-806-2

斑节对虾杆状病毒 (*Penaeus monodon-type baculovirus, MBV*)，是一种产生球形包涵体的杆状病毒。国际病毒分类委员会 (ICTV) 也称它为 *PmSNPV* (从斑节对虾分离的单层囊膜的核多角体病毒)，但通常仍称为 MBV。MBV 是对虾幼体、仔虾和稚虾早期阶段的潜在病原。病毒宿主范围广，在养殖和野生对虾中广泛分布。但在正常情况下并不会生病，只在环境恶劣时会暴发疾病，引起斑节对虾大量死亡。该病的特征是在肝胰腺和中肠腺感染了病毒的细胞核内出现成堆的球状包涵体。

为了适应 MBV 的快速检测和疫病研究的需要，本公司参照严格依据 OIE 发布的水生动物疾病诊断手册 2019 版和 SN/T1151.3-2013 中规定的 MBV 嵌套 PCR 检测引物序列及其循环数等技术标准，经多次实验及系统优化，开发生产了本试剂盒。应用本试剂盒进行核酸提取和 PCR 检测具有快速、灵敏、特异、准确、安全、操作简单、应用广泛等特点及优点。

2、试剂盒组成

试剂盒组成包括核酸提取试剂和核酸扩增试剂，具体组成参见表 1：

表 1：试剂盒组成 (50test/盒)

组成成分	体积
核酸扩增试剂：DEPC 水	8ml × 1 管
MBV 嵌套 PCR 反应液	750μl × 1 管
Taq 酶 (5U/ul)	40μl × 1 管
阴性对照	1ml × 1 管
MBV 阳性对照	1ml × 1 管

3、嵌套 PCR 检测

3.1 样本的处理 (在样本制备区进行)：

嵌套 PCR：如果第一次 PCR 后产物电泳时看不到 DNA 带，取 2.5 μL 产物做模板；如果第一次 PCR 后产物电泳时能看到 DNA 带，只是要求进一步核实，则需将产物按 1: 100 稀释后，取 2.5 μL 产物做模板。向每个 PCR 管孔中各分装 15 μL 的混合液，再加入普通 PCR 产物模板 2.5 μL，补加 DEPC 水 7.5 μL，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。(注：试剂盒中的阳性对照直接作为 PCR 检测的模板，无需提取核酸)

3.2 扩增试剂准备 (在反应混合物配制区进行)：

从试剂盒中取出相应的嵌套 PCR 反应液、Taq 酶，在室温下融化后，2 000 r/min 离心 5 s。设所需嵌套 PCR 检测总数为 n，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和，每个样品测试反应体系配制见下表 2：

表 2 每个样品测试反应体系配制表

试剂	PCR 反应液	Taq 酶	合计
用量	14.5 μ L	0.5 μ L	15 μ L

3.3 加样（样本处理区进行）：

在各设定的PCR管中分别加入上述样本处理步骤3.1中制备的DNA溶液各2.5 μ L，补加DEPC水7.5 μ L，盖紧管盖，500 r/min离心30 s。（阳性对照不需要提取核酸，可以直接吹打混匀后吸取当模板）

3.4 PCR 检测（在检测区进行）：

第一阶段，96 $^{\circ}$ C/5 min；

第二阶段，94 $^{\circ}$ C/30 sec, 60 $^{\circ}$ C/30sec, 72 $^{\circ}$ C/60sec；35个循环；

第三阶段，72 $^{\circ}$ C/10 min；

第四阶段，4 $^{\circ}$ C 保存

4、琼脂糖电泳

用电泳缓冲液制备 1.5%的琼脂糖凝胶平板。将平板放入水平电泳槽，使电泳缓冲液刚好没过胶面，向 PCR 扩增产物中加入 1/6 体积的电泳上样缓冲液（6X 上样缓冲液），按比例混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA DL2000 Marker 做对照。5 V/cm 电泳约 0.5h，当溴酚蓝到达一定位置时停止。在紫外灯下或凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带，拍摄并记录。

5、结果判定

5.1 嵌套 PCR 后，阳性对照会出现一条 361 bp 的 DNA 片段。阴性对照和空白对照没有该核酸带。

5.2 嵌套 PCR 扩增后能在相应 361 bp DNA 位置上有带，可判为 MBV 核酸阳性。

6、相关技术信息

MBV 嵌套 F: 5`-TCCAATCGCGTCTGCGATACT-3`

MBV 嵌套 R: 5`-CGCTAATGGGGCACAAGTCTC-3`