

## 对虾白斑综合征病毒 (WSSV) 荧光 PCR 检测试剂盒说明书

### 1、试剂盒简介

货号：HB-801-1

对虾白斑综合征病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 是全球范围内广泛流行并严重威胁虾养殖业的主要病原体，它引起的虾白斑综合征 (Whitespot syndrome, WSS) 是世界动物卫生组织 (International Office of Epizootic Disease, OIE) 规定的必需上报的疫病。为了适应对虾白斑病毒 (WSSV) 快速检测和监测的需要，本公司参照最新发布的OIE水生动物疾病诊断手册2.2.8中推荐的引物和探针序列，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          |
|-----------------|-------------|
| 样品 DNA 提取液 1    | 5ml × 1 管   |
| 样品 DNA 提取液 2    | 500μl × 1 管 |
| 核酸扩增试剂： DEPC 水  | 5ml × 1 管   |
| WSSV 荧光 PCR 反应液 | 750μl × 1 管 |
| Taq 酶 (5U/ul)   | 40μl × 1 管  |
| 阴性对照            | 1ml × 1 管   |
| WSSV 荧光阳性对照     | 1ml × 1 管   |

\*保存条件：样品 DNA 提取液 1、2 和试剂盒须在-20℃保存。

### 3、样本采集，存放及运输

3.1 样本采集：所用取样器材必须经高压灭菌并烘干。

受精卵、3cm以下幼虾、仔虾、幼体采集整条对虾作为样品，成虾采集上皮、肝胰腺、肠或腮作为样品。用搅拌器将样品匀浆成糊状取30mg于离心管中，按照试剂盒配套的DNA 抽提试剂操作说明提取DNA模板。

3.2 存放：研磨后的样本在2℃-8℃条件下保存应不超过24 h；-70℃以下可长期保存，但应避免反复冻融（最多冻融3次）。

3.3 运输：采用冰壶或泡沫箱加冰密封进行运输。

### 4、检测步骤

#### 4.1 DNA 核酸提取操作方法(在样本处理区进行)：

4.1.1 取 n 个 1.5ml 灭菌 Eppendorf 管，其中 n 为待检样品数和一管阴性对照之和，对每个管进行编号标记。(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)

4.1.2 每管加入 100 μl DNA 提取液 1，然后分别加入待测样本和阴性对照各 100μl，一份样本换用

一个吸头；混匀器上震荡混匀 5 s，于 4°C~25°C 条件下，12 000 r/min 离心 10 min。

4.1.3 尽可能吸弃上清且不碰沉淀，再加入 10μl DNA 提取液 2，混匀器上震荡混匀 5s，于 4°C~25°C 条件下，2 000 r/min 离心 10 s。

4.1.4 100°C 干浴或沸水浴 10 min；加入 90μl DEPC 水，12 000 r/min 离心 10 min，吸取上清，即为提取的 DNA，冰上保存待用（提取的 DNA 需在 2 h 内进行 PCR 扩增或放置于-70°C 冰箱内保存）。

## 4.2 荧光 PCR 检测

4.2.1 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荧光 PCR 反应液、Taq 酶，2000×g 离心 5 秒钟。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 | 荧光 PCR 反应液 | Taq 酶  | 合计    |
|----|------------|--------|-------|
| 用量 | 14.5 μL    | 0.5 μL | 15 μL |

4.2.2 加样（样本处理区进行）：

向每个荧光 PCR 管孔中各分装 15 μL 的混合液，再分别加入样本 DNA 模板 10 μL，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）

4.2.3 PCR 检测（在检测区进行）：

循环条件设置：

第一阶段，95°C/3 min；

第二阶段，95°C/15 sec，60 °C/40 sec，40 个循环，在第二阶段每次循环的退火延伸时收集荧光。试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

## 5、结果判定

5.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

5.2 质控标准

5.2.1 阴性对照无 Ct 值或无扩增曲线。

5.2.2 阳性对照的 Ct 值应<28.0，并出现典型的扩增曲线。否则，此次实验视为无效。

5.3 结果描述及判定

5.3.1 阴性

无Ct值或无扩增曲线，示样品中无WSSV核酸。

5.3.2 阳性

Ct值≤30，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在WSSV核酸。

5.3.3 有效原则

Ct>30 的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性，否则为阳性。

## 6、相关技术信息

F: 5'-TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG-3'

R: 5'-GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A-3'

Probe: 5'FAM-AGC-CAT-GAA-GAA-TGC-CGT-CTA-TCA-CAC-A-3'BHQ1.