

对虾白斑病毒 (WSSV) 嵌套 PCR 检测试剂盒说明书

1、试剂盒简介

货号：HB-801-3

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。WSSV 的宿主广泛, 它几乎能感染所有类型的养殖虾和别的甲壳动物, 并感染孵化期的虾苗, 在 3 d~7 d 使感染的虾病死率达到 90 %~100 %。1993 年中国因 WSSV 感染使对虾养殖减产 70 %, 1996 年泰国因 WSSV 感染导致对虾减产 70 000 吨 (占泰国总产量的 40 %)。尽管 WSSV 对全球虾养殖业的危害已逐渐引起人们的关注, 但对 WSSV 的防治至今无有效措施, 近几年来该病在东亚和东南亚国家和地区的流行仍有报道。WSSV 为双链 DNA (dsDNA) 病毒, 由三十多万碱基组成, 约含 181 个开放读码框架 (ORF)。PCR 方法是目前检测 WSSV 最常用、最敏感的方法。

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 OIE 水生动物疾病诊断手册 2.2.8 中推荐的引物序列, 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 |
|-----------------|-------------|
| 核酸扩增试剂: DEPC 水 | 8ml × 1 管 |
| WSSV 嵌套 PCR 反应液 | 750μl × 1 管 |
| Taq 酶 (5U/ul) | 40μl × 1 管 |
| 阴性对照 | 1ml × 1 管 |
| WSSV 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，94 $^{\circ}$ C/4 min；

第二阶段，94 $^{\circ}$ C/1 min，55 $^{\circ}$ C/1 min；72 $^{\circ}$ C/2 min；40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 941 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 941 bp DNA 位置上有带，可判为 WSSV 核酸阳性。

6、相关技术信息

146F2 (5`-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3`)

146R2 (5`-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3`)